Imacidin, ein neues Engspektrum-Antibioticum

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

ANETTE BRECHT-FISCHER

geb. Fischer

aus Strang/Bad Rothenfelde

78 368

1978

Imacidin, ein neues Engspektrum-Antibioticum

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

ANETTE BRECHT-FISCHER

geb. Fischer

aus Strang/Bad Rothenfelde

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Mai 1978

Dekan	:	Professor Dr. K.-P. Hadeler
1. Berichterstatter	:	Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter	:	Professor Dr. V. Braun

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I der Universität Tübingen durchgeführt.
Für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und die vielen wertvollen Anregungen danke ich Herrn Prof. Dr. H. Zähner.

Mein Dank gilt weiterhin den Herren Dr. H. Laatsch und P. Ruß, Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen, für ihre Arbeiten zur Strukturaufklärung der Antibiotica Imacidin und 1424.

Herrn K. Wusch möchte ich für das Zeichnen der Abbildungen danken.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0047

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1.	Chemikalien	4
2.2.	Nährmedien	5
2.2.1.	Nährlösungen zur Streptomyceten-Anzucht	5
2.2.2.	Anderweitig verwendete Nährmedien	6
2.3.	Organismen für das Wirkungsspektrum	8
2.4.	Herstellung verschiedener Sporensuspensionen	11
2.4.1.	Tü 57 und Tü 22	11
2,4.2.	Bacillus subtilis	11
2.5.	Optimierung	12
2.5.1.	von Tü 1379	12
2.5.2.	von Tü 1424	12
2.6.	Fermentation von Tü 1379	13
2.7.	Aufarbeitung und Reinigung von Imacidin	13
2.7.1.	Erste Anreicherung	14
2.7.2.	Craig-Verteilung	14
2.7.3.	Weitere Reinigungsschritte	15
2.8.	Chemische und physikalische Charakterisierung des Antibioticums Imacidin	15
2.8.1.	Dünnschichtchromatographie	15
2.8.2.	Elektrophorese	16
2.8.3.	UV-Absorptionsspektrum	16
2.9.	Biologische Charakterisierung der Antibiotica Imacidin und 1424	16
2.9.1.	Agardiffusionstest	16
2.9.2.	Verdünnungsreihentest	17
2.9.3.	Herstellung Imacidin-resistenter Tü 57-Mutanten	18
2.9.4.	Versuch zur Inaktivierung von Imacidin und 1424 durch Escherichia coli, Bacillus subtilis und Gaffkya homari	18

		Seite
2.9.5.	Wachstumskurven mit Imacidin und 1424	19
2.9.6.	Einfluß der beiden Antibiotica auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese	19
2.9.7.	Einfluß von Imacidin und 1424 auf die Mureinsynthese	20
2.9.7.1.	^{14}C-N-Acetylglucosamin-Aufnahme in ganze Zellen	20
2.9.7.2.	^{14}C-N-Acetylglucosamin-Aufnahme ins Murein	21
2.9.7.3.	Versuch zur Anreicherung von Mureinvorstufen	22
2.9.8.	Kombinationsversuche mit anderen Antibiotica	23
2.9.9.	Osmostabilität von Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus unter Imacidin-Einfluß	23
3.	ERGEBNISSE	25
3.1.	Beschreibung der Produzentenstämme Tü 1379 und Tü 1424	25
3.2.	Optimierung	26
3.2.1.	von Tü 1379	26
3.2.2.	von Tü 1424	27
3.3.	Herstellung des Antibioticums Imacidin	28
3.3.1.	Fermentation von Tü 1379	28
3.3.2.	Aufarbeitung und Reinigung	30
3.4.	Chemische und physikalische Charakterisierung von Imacidin	32
3.5.	Imacidin-resistente Tü 57-Mutanten	33
3.6.	Struktur der beiden Antibiotica	36
3.7.	Biologische Charakterisierung und Wirkungsweise	37
3.7.1.	Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers im Agardiffusionstest von der Imacidin-Konzentration	37
3.7.2.	Wirkungsspektrum	38

		Seite
3.7.3.	Einfluß verschiedener Bakterien auf Imacidin und 1424	42
3.7.4.	Wachstumskurven und minimale Hemmkonzentrationen	43
3.7.5.	Wirkungen auf die Makromolekülsynthesen	46
3.7.5.1.	DNS-, RNS- und Proteinsynthese in vivo	46
3.7.5.2.	Mureinsynthese	49
3.7.6.	Anreicherung von Mureinvorstufen	52
3.7.7.	Wirkung von Imacidin und 1424 in Kombination mit anderen Antibiotica	54
3.7.8.	Osmostabilität einiger Bakterien unter Imacidin-Einfluß	56
4.	DISKUSSION	58
4.1.	Stenothricin, Stenocidin, 1424 und Imacidin: Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Struktur und biologischem Verhalten	58
4.2.	Mureinstruktur und Angriffspunkte zellwandhemmender Antibiotica	62
4.3.	Überlegungen zum Synergismusphänomen	74
4.4.	Ausblicke	75
5.	ZUSAMMENFASSUNG	78
6.	LITERATURVERZEICHNIS	79

Verwendete Abkürzungen:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA
cpm	counts per minute
Dab	Diaminobuttersäure
Dpm	Diaminopimelinsäure
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Hsr	Homoserin
HyDpm	Hydroxydiaminopimelinsäure
3-Hyg	Threo-3-Hydroxyglutaminsäure
HyLys	Hydroxylysin
MIC	Minimale Hemmkonzentration
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
NCIB	National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen, Scotland
rpm	Umdrehungen pro Minute
Sar	Sarkosin
TCA	Trichloressigsäure
Tü	Stammsammlung des Lehrbereichs Mikrobiologie I der Universität Tübingen
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
v/v	Verhältnis von Volumenteilen

Die Abkürzungen für die Aminosäuren entsprechen dem internationalen Gebrauch.

1. EINLEITUNG

Seit Jahrzehnten wird intensiv nach neuen Antibiotica gesucht und auch heute kann die Notwendigkeit dieser Suche wohl nicht in Frage gestellt werden. Auf den verschiedensten Gebieten im Bereich der medizinischen und außermedizinischen Anwendung besteht laufend eine Nachfrage nach neuartigen Substanzen, die zum einen dadurch bedingt ist, daß ältere Antibiotica auf Grund wachsender Resistenzprobleme abgelöst werden müssen, zum anderen aber auch durch die Neuerschließung von Einsatzgebieten wie z.B. Protozoen- und Wurmerkrankungen oder Insekten- bzw. Nematodenbefall in der Landwirtschaft. Ein besonders krasses Beispiel einer durch die bisherigen Mittel nicht ausreichend bekämpfbaren Parasitose stellt die Onchozerkose dar, deren Wurmerreger durch eine Überträgermücke den nächsten Wirt erreicht (WIRTZ, 1978). Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation leiden 20-40 Millionen Menschen in tropischen Gegenden an dieser Krankheit, die deshalb für die Entwicklungsländer enorme volkswirtschaftliche Probleme aufwirft. Weder für die Vernichtung der Würmer im Menschen noch für eine Bekämpfung der Überträgermücke stehen bis jetzt geeignete Mittel zur Verfügung.

Entscheidend für den Erfolg einer Antibiotica-Suche ist das Screening -Modell, bei dem es zwei variable Größen gibt: die Mikroorganismen und die Methode, nach der das Screening abläuft (ZÄHNER, 1977).
Von Bedeutung ist zunächst einmal die Auswahl der Mikroorganismen, die auf Antibioticabildung getestet werden sollen. Neben den klassischen Produzenten wie Streptomyces-, Aspergillus- und Bacillus-Arten untersuchen heute einige Arbeitsgruppen ungewöhnliche Mikroorganismen wie Actinoplanes (CORONELLI et al., 1976), Thermoactinomyces

(PIRALI et al., 1974), Myxobacterium (RINGEL et al., 1977) und andere mehr.
Dieses Ausweichen auf seltene Produzentengruppen mag eine Möglichkeit sein, die immer größer werdende Diskrepanz zwischen Arbeitsaufwand und Anzahl der neuen Antibiotica einzudämmen. Wie effektiv diese Methode tatsächlich ist, werden die folgenden Jahre zeigen.
Wenn man davon ausgeht, daß mit dem bisherigen klassischen Screening nur ein geringer Teil der potentiell möglichen Sekundärmetaboliten erfaßt wird, so sollte eine Veränderung der Testmethoden auch zu neuen Substanzen führen. Dabei erscheint es sinnvoll, die Testsysteme nicht nach dem Gesichtspunkt der späteren Anwendung auszurichten, sondern ganz allgemein neue Naturstoffe zu suchen. Das Screeningmodell, ob damit nun eng wirkende oder nur in Zusammenhang mit Hilfsstoffen wirkende antimikrobielle Substanzen, Aktivitäten auf Nematoden oder ob damit auf bestimmte chemische Reaktionen ansprechbare Sekundärmetaboliten gefunden werden, dient nur noch zum Entdecken und Wiedererkennen während der Isolierung. Daran schließt sich natürlich das Problem der raschen chemischen Identifizierung an. Erst danach sollte die neue Substanz auf ihre Fähigkeiten im medizinischen und außermedizinischen Bereich untersucht werden.
Jedoch ist nicht nur die Testmethode beim Screening von Bedeutung, sondern auch die Bedingungen, unter denen die Mikroorganismen gezüchtet werden wie Temperatur, Belüftung, Nährmedium, Impfalter usw.. Wechselnde Umweltbedingungen des Produzenten können den Sekundärstoffwechsel wesentlich beeinflussen (HOPWOOD & MERRICK, 1977), und z.B. das Gleichgewicht einer Reaktion so verschieben, daß ein bestimmtes Produkt angehäuft wird.

Man macht immer wieder die Erfahrung, daß beim gleichen Screening ähnliche oder verwandte, von verschiedenen Mikroorganismen produzierte Antibiotica zu finden sind, so

z.B. Kirromycin (WOLF et al., 1972) und Kirrothricin (THEIN, 1977) sowie die in dieser Arbeit behandelte Gruppe Imacidin, 1424 und Stenocidin/Stenothricin. Die vier letztgenannten Antibiotica fielen in einem entsprechenden Screening durch ihr enges Wirkungsspektrum auf. Imacidin und die Substanz 1424 zeigten mit EDTA als Hilfsstoff auf dem Testorganismus Streptomyces viridochromogenes eine verstärkte Wirkung, die jedoch nur bei relativ geringen Konzentrationen auftritt.
In der vorliegenden Arbeit sollten die biologischen Eigenschaften und die Wirkungsweise des Imacidins sowie im Vergleich dazu die des Antibioticums 1424 näher untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Es wurden analysenreine Chemikalien der Firma E. Merck AG, Darmstadt, verwendet und daneben folgende Substanzen anderer Firmen:

Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Malt Extract	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Nutrient Broth	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, USA
Distiller Soluble	Ciba AG, Basel, Schweiz
D-Glucose	Deutsche Maizenawerke, Hamburg
Lab. Lemco Powder	Oxoid Ltd., London, England
L-Histidin	Fluka AG, Buchs SG, Schweiz
Sojamehl	Henselwerke, Magstadt/Stuttgart
Niax Polyol LHT 67	Brenntag, Mühlheim/Ruhr
Hyphlo-Supercel	Hedinger, Stuttgart
Tween 80	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg
Amberlite XAD-2 (300 - 1000 μ)	Rohm & Haas Co., Philadelphia,USA
Sephadex LH 20	Deutsche Pharmacia, Frankfurt

Sämtliche Radiochemikalien wurden von Radiochemical Center, Amersham, England, bezogen:

N-Acetyl-D(^{14}C)-Glucosamin, spez. Aktivität 58 mCi/mMol

^{14}C-L-Isoleucin, spez. Aktivität 100 mCi/mMol

^{14}C-Thymidin, spez. Aktivität 61 mCi/mMol

^{14}C-Uracil, spez. Aktivität 61 mCi/mMol

Antibiotica zu Vergleichszwecken:

Actinomycin D	Bayer AG, Wuppertal-Elberfeld
Chloramphenicol	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Echinomycin	Prof. Dr. Keller-Schierlein, ETH, Zürich
Enduracidin	Takeda Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Erythromycin	Eli Lilly & Co., Indianapolis, USA
Fusidinsäure	Löwens Pharma GmbH & Co. KG, Düsseldorf
Manumycin	P.D. Dr. Zeeck, Org.-Chem. Institut der Universität Göttingen
Penicillin G	Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt
Rifampicin	Chemie Grünenthal, Berlin
Tetracyclin	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Alle weiteren verwendeten Antibiotica stammen aus der Antibioticasammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie I, Tübingen.

2.2. Nährmedien

2.2.1. Nährlösungen zur Streptomycetenanzucht

Nr. 1	Sojamehl	2 %
	Glucose	2 %
	Leitungswasser	
	pH 7,0	
Nr. 2	Sojamehl	2 %
	Glucose	2 %
	$CaCO_3$	1 %
	Leitungswasser	
	pH 7,5	
Nr. 3	Fleischmehl	2 %
	Malzextrakt	2 %

	$CaCO_3$	1 %
	Leitungswasser	
	pH 7,2	
Nr. 4	Malzextrakt	2 %
	Distiller Soluble	2 %
	NaCl	0,5 %
	$NaNO_3$	0,1 %
	Leitungswasser	
	pH 7,2	

2.2.2. Anderweitig verwendete Medien

Nr. 5	Hefeextrakt	0,4 %
	Malzextrakt	1 %
	Glucose	0,4 %
	Agar	1,9 %
	ention. Wasser	
	pH 7,3	
Nr. 5'	Hefeextrakt	0,2 %
	Malzextrakt	0,5 %
	Glucose	0,2 %
	Agar	1,9 %
	ention. Wasser	
	pH 7,3	
Nr. 6	Nutrient Broth	0,8 %
	NaCl	0,5 %
	Agar	1,9 %
	ention. Wasser	
	pH 7,2	

Nr. 7	Fleischextrakt	1 %	
	Pepton	1 %	
	NaCl	0,5 %	
	Agar	1,5 %	
	ention. Wasser		
	pH 7,2		
Nr. 8	Trypton	1 %	
	Hefeextrakt	0,5 %	
	K_2HPO_4	1,4 %	
	Glucose	1,1 %	(extra sterili-
	Agar	2 %	sieren)
	ention. Wasser		
	pH 7,6		
Nr. 9	Pepton	1 %	
	Fleischextrakt	1 %	
	NaCl	0,3 %	
	$Na_2HPO_4.2H_2O$	0,15 %	
	Glucose	0,5 %	
	Agar	1,8 %	
	ention. Wasser		
	pH 7,6		
Nr. 10	Fleischextrakt	0,3 %	
	Malzextrakt	0,3 %	
	Hefeextrakt	0,3 %	
	Pepton	2 %	
	Ascorbinsäure	0,02 %	
	Glucose	0,5 %	(extra sterili-
	Agar	1,5 %	sieren)
	ention. Wasser		
	pH 6,9		
Nr. 11	Micro Inoculum Broth	0,8 %	
	Agar	1,5 %	
	ention. Wasser		

Nr. 12	K_2HPO_4	0,5 %
	Hefeextrakt	1 %
	Glucose	1 %
	Pepton	1 %
	Agar	1,9 %
	ention. Wasser	

Zur Herstellung der entsprechenden flüssigen Nährlösungen wurde die im Rezept angegebene Agarmenge weggelassen.
Die Sterilisierung der Nährmedien erfolgte für 20 min bei 120°C.

2.3. Organismen für das Wirkungsspektrum

Tab. 1: Genaue Stammbezeichnung der verwendeten Mikroorganismen sowie Angabe des Mediums und der Inkubationstemperatur

	Medium Nr.	Temperatur (°C)
BAKTERIEN		
Pseudomonas fluorescens Migula - ATCC 13525	5	27
Pseudomonas lachrymans B 19 (Smith & Bryan) Carsner	7	27
Pseudomonas saccharophila Doudoroff - ATCC 15946	5	27
Agrobacterium tumefaciens (Smith & Townsend) Conn - ATCC 11095	7	27
Achromobacter spec. - Göttingen	5	27
Escherichia coli (Migula) Castellani & Chalmers K 12	7	37

Fortsetzung Tab. 1

Proteus mirabilis - Hauser, Darmstadt	6	37
Micrococcus roseus Flügge - ATCC 178	6	27
Staphylococcus aureus Rosenbach - Tü 202 (= ETH 2070)	7	37
Streptococcus faecalis - ATCC 9790	8	37
Leuconostoc mesenteroides P-60 (Cienkowski) van Tieghem - ATCC 8042	11	27
Gaffkya homari - Hammes, München (nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology heute Aerococcus viridans)	12	34
Sarcina lutea Schroeter - ATCC 381	6	27
Bacillus brevis Migula - ATCC 9999	7	37
Bacillus megaterium Bary - ATCC 13632	6	37
Bacillus subtilis Cohn - ATCC 6051	7	37
Clostridium pasteurianum Winogradsky - ATCC 6013	10	30
Lactobacillus casei (Orla - Jensen) Holland - ATCC 7469	11	27
Corynebacterium insidiosum (McCulloch) Jensen	7	27
Corynebacterium poinsettiae Starr & Pirone - ATCC 9682	7	27
Corynebacterium rathayi (Smith) Dowson - ATCC 13659	7	27
Arthrobacter aurescens (Clark) Phillips - ATCC 13344	5	27
Arthrobacter crystallopoietes Ensign & Rittenberg - ATCC 15481	6	27
Arthrobacter pascens Lochhead & Burton - ATCC 13346	5	27
Arthrobacter simplex (Jensen) Lochhead - NCIB 8929	5	27
Brevibacterium flavum Ajinomoto Co. - ATCC 14067	6	27

Fortsetzung Tab. 1

Brevibacterium linens (Weigmann) Breed - ATCC 9172	5	27
Propionibacterium freudenreichii - Sahm, Stöckheim	10	37
Mycobacterium phlei 610 - Tü 206	5	27
Mycococcus spec. - ATCC 13556	6	27
Streptosporangium roseum	5	27
Nocardia brasiliensis (Lindenberg) Pinoy - NRRL 2962	7	27
Streptomyces antibioticus (Waksman & Woodruff) Waksman & Henrici - Tü 4	5	37
Streptomyces collinus Lindenbein Tü 105	5	27
Streptomyces fradiae (Waksman & Curtis) Waksman & Henrici - Tü 27	5	27
Streptomyces glaucescens (Gause et al.) Hütter - Tü 49	5	27
Streptomyces griseus Waksman & Henrici - Tü 17	5	27
Streptomyces lavendulae (Waksman & Curtis) Waksman & Henrici - Tü 35	5	27
Streptomyces prasinus Ettlinger et al. - Tü 30	5	27
Streptomyces ramulosus Ettlinger et al. - Tü 34	5	27
Streptomyces violaceoruber (Waksman & Curtis) Waksman - Tü 22	5	37
Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksman & Henrici - Tü 57	5	37
PILZE		
Botrytis cinerea Persoon ex Fr. -Tü 157	5	30
Candida albicans (Robin) Berkhout - Tü 164	6	27

Fortsetzung Tab. 1

Paecilomyces varioti Bainier - Tü 137	5	27
Saccharomyces cerevisiae - Tü 25	6	27
Mucor hiemalis Wehmer - (+) Tü 179 x (-) Tü 180	5	20

2.4. Herstellung verschiedener Sporensuspensionen

2.4.1. von Tü 57 und Tü 22

Tü 57 (Streptomyces viridochromogenes) und Tü 22 (Streptomyces violaceoruber) dienten routinemäßig als Teststämme. Um immer gleiches Ausgangsmaterial zur Verfügung zu haben, wurden Sporensuspensionen nach der folgenden Beschreibung hergestellt:
Jeweils 2 500 ml-Erlenmeyer-Kolben mit je 100 ml festem Nährmedium Nr. 5 (für Tü 22 Nr. 5') wurden vom Schrägagarröhrchen beimpft und anschließend solange bei 37°C inkubiert bis das Luftmycel ausgereift war (10 - 14 Tage). Mit 80 ml einer Tween-80-Lösung (1 Tropfen Tween 80 auf 100 ml entionisiertem Wasser) schwemmte man beide Kolben ab und filtrierte die Lösung durch sterile Glaswatte. Den Titer bestimmte man anschließend in einer Thoma-Zählkammer. Die Sporensuspensionen lassen sich bis zu 4 Wochen bei +4°C aufbewahren.

2.4.2. von Bacillus subtilis

Die Sporensuspension von Bacillus subtilis wurde nach der Beschreibung von WOLF (1971) hergestellt; allerdings verwendete man das Nährmedium Nr. 7.

2.5. Optimierung

2.5.1. von Tü 1379

Nachdem bekannt war, daß das Antibioticum Imacidin 2 Moleküle Histidin enthält und dies bei der Fermentation durchaus ein limitierender Faktor sein kann, wurde dem Produzentenstamm Tü 1379 Histidin angeboten.
500 ml-Erlenmeyer-Kolben (Füllmenge 100 ml) mit 1 seitlichen Einstich wurden mit Nährlösung Nr. 1 und verschiedenen Histidinzusätzen gefüllt, mit Tü 1379 beimpft und auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 120 rpm und 27°C für 6 Tage inkubiert. Bei der Schüttelmaschine handelt es sich um den Typ RC 106 der Infors AG, Basel, Schweiz.
Die genauen Histidinmengen sind dem Ergebnisteil (3.2.1.) zu entnehmen.
Täglich wurden Proben genommen und auf ihren Antibioticumgehalt getestet.

2.5.2. von Tü 1424

Tü 1424 wurde in 500 ml-Erlenmeyer-Kolben (Füllmenge 100 ml) ohne seitlichen Einstich, mit 1 und 4 seitlichen Einstichen und den Nährmedien Nr. 1, 2 und 4 auf der rotierenden Schüttelmaschine bei 120 rpm und 27°C für 10 Tage angezogen. Die täglich entnommenen Proben wurden auf ihren Gehalt an 1424 hin untersucht.
In einem anschließenden Versuch komplettierte man die Nährlösung Nr. 2 mit verschiedenen Prolinmengen (Genaueres im Ergebnisteil 3.2.1.) und bestimmte den Antibioticumgehalt durch Agardiffusionstest.

2.6. Fermentation von Tü 1379

Drei Tage alte Schüttelkulturen von Tü 1379 (500 ml-Erlenmeyer-Kolben mit 1 seitlichen Einstich, mit Histidin optimierte Nährlösung Nr. 1, rotierende Schüttelmaschine mit 120 rpm bei 27°C) dienten als Impfmaterial (10 %) für einen 10 l-Fermenter (Modell MF 14, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, USA). Dieser war mit 9 l Nährlösung 30 min bei 134°C sterilisiert worden. Die Luftmenge betrug 240 l/h und die Rührgeschwindigkeit 160 rpm.
Nach 24-stündiger Inkubation wurde mit dieser Kultur ein 100 l-Fermenter (New Brunswick) angeimpft, der mit folgenden Bedingungen betrieben wurde: 1700 l Luft/h, 120 rpm.
Eine zu starke Schaumentwicklung ließ sich durch wiederholte Zugabe einer äthanolischen Polyollösung (v/v) verhindern.
Während der Fermentation nahm man zu verschiedenen Zeiten Proben, die nach folgenden Punkten ausgewertet wurden:

- Der pH-Wert wurde mit einem Labor-pH-Meter gemessen.
- Die Sedimentmenge wurde durch Zentrifugation (10 min bei 3000 rpm) von 10 ml Kultur in graduierten Zentrifugenröhrchen ermittelt.
- Der Antibioticumgehalt wurde durch Agardiffusionstest auf Tü 22 bestimmt, indem der Wert für das Kulturfiltrat und für das mit Wasser gewaschene und mit Methanol (v/v) extrahierte Mycel ermittelt wurde.

2.7. Aufarbeitung und Reinigung von Imacidin

Die Kulturbrühe wurde unter Zusatz von 2 % Celit mit einer Filterpresse (Fa. Schenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd) filtriert.

Die Extraktion des Mycels einer Fermentation im 100 l-Maßstab erfolgte mit ca. 20 l Methanol; danach ließ sich der Extrakt bis zum wäßrigen Rückstand einengen und mit dem Kulturfiltrat zusammen weiter aufarbeiten.

2.7.1. Erste Anreicherung

Kulturfiltrat und wäßriger Mycelextrakt wurden nach Kontrollierung des pH-Werts und eventueller Einstellung auf pH 6 über eine Amberlite XAD-2-Säule (ca. 100 g XAD-2/l Kulturflüssigkeit) gegeben. Die Säule wurde mit Wasser solange gewaschen, bis die auslaufende Flüssigkeit farblos war. Anschließend gab man ca. 5 Säulenvolumina eines Methanol/Wasser-Gemisches (40 % Methanol) über die Säule. Die Elution der aktiven Substanz erfolgte mit 80 % Methanol.

2.7.2. Craig-Verteilung

Das eingeengte Eluat der Amberlite XAD-2-Säule unterlag im nächsten Schritt einer multiplikativen Verteilung nach Craig (KING & CRAIG, 1962), die in der Apparatur der Fa. W. Schmid, Basel, Schweiz, durchgeführt wurde. Die Unterphase bestand aus Wasser, die Oberphase aus einem Gemisch von 20 % Butanol und 80 % Äthylacetat. Die Verteilung erfolgte über 100 Stufen, wobei jeweils 30 Schüttelbewegungen und 8 Minuten Trennzeit eingestellt wurden.
Die Verteilung der Aktivität in den einzelnen Gefäßen wurde durch Agardiffusionstest ermittelt und die Imacidin-enthaltende Flüssigkeit eingeengt und lyophilisiert.

2.7.3. Weitere Reinigungsschritte

Als nächstes wurde das Substanzgemisch auf eine Kieselgel-Säule (Kieselgel 60 in Chloroform) aufgetragen, die mit drei Säulenvolumina Chloroform gewaschen wurde. Die aktive Substanz ließ sich mit dem Lösungsmittelgemisch Chloroform/Methanol (60:40) eluieren.

Der letzte Reinigungsschritt erfolgte an einer nach der Molekülgröße trennenden Sephadex LH 20-Säule in Methanol.

2.8. Chem. und phys. Charakterisierung des Antibioticums Imacidin

2.8.1. Dünnschichtchromatographie

Es wurden fertige Kieselgel 60/Kieselgur F 254-Alufolien der Fa. E. Merck AG, Darmstadt, verwendet. Als optimales Fließmittel erwies sich ein Gemisch aus 60 Teilen Methanol, 40 Teilen Chloroform und 0,5 Teilen 25 %iger Ammoniaklösung.
Die Rf-Werte sind im Ergebnisteil (3.4.) aufgeführt.
Imacidin konnte auf den Dünnschichtplatten durch zwei verschiedene Methoden nachgewiesen werden:

- durch Bioautographie mit Tü 57-Testplatten (Methode beschrieben bei KIRST, 1971).
- durch ein Sprühreagenz[1], das auf das im Antibioticum enthaltene Histidin anspricht:
  A: 1 % p-Anisidin in alkoholischer 1 N HCl (10 g p-Anisidin, 19 ml 6 N HCl, Äthanol ad 1 l)

[1] Den Hinweis auf dieses Sprühreagenz erhielt ich freundlicherweise von Herrn Dr. H. Laatsch, Org.-Chem. Institut der Universität Göttingen.

B: 10 % Pentylnitrit in Äthanol
C: 1 % KOH in Äthanol
A und B werden zu gleichen Teilen miteinander vermischt; nach ca. 5 min Wartezeit wird das Chromatogramm damit besprüht und im trockenen Zustand anschließend mit C behandelt.
Imacidin gibt einen roten Fleck auf hellbraunem Grund.

2.8.2. Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde in der Apparatur der Fa. Serva, Heidelberg, mit Puffern verschiedener pH-Werte für 30 min bei 220 Volt durchgeführt.
Acetat-Puffer: pH 5,0
Phosphat-Puffer: pH 7,0
Veronal-Puffer: pH 8,6

2.8.3. UV-Absorptionsspektrum

Das UV-Absorptionsspektrum wurde mit dem Gerät Varion Techtron UV-Vis Spektrophotometer, Modell 635, aufgenommen, wozu man die Substanz in Methanol löste.

2.9. Biologische Charakterisierung der Antibiotica Imacidin und 1424

2.9.1. Agardiffusionstest

Dieser nach ZÄHNER & MAAS, 1972, durchgeführte Test diente zur routinemäßigen qualitativen und quantitativen

Erfassung der Antibioticumsaktivität.
Um eine konstante Einsaatdichte der Testplatten zu gewährleisten, bestimmte man den Titer der unter 2.4.1. beschriebenen Sporensuspensionen und gab zu 100 ml Medium Nr. 5 die Sporenmenge, die bei Tü 57 $1x10^8$ Sporen, bei Tü 22 $5x10^7$ Sporen enthielt.
Die so hergestellten Platten konnten im Kühlschrank bei $+4^oC$ ohne Qualitätsverlust ca. 14 Tage lang aufbewahrt werden. Nach längerer Lagerung waren die Testplatten zur quantitativen Bestimmung der Aktivität nicht mehr geeignet, da nur noch ein Teil der Sporen auskeimte.

Bei der Bestimmung des Wirkungsspektrums wurde ebenfalls der Agardiffusionstest angewendet.
Hierzu wurden die Streptomyceten-Platten analog dem oben beschriebenen Verfahren bei Tü 57 gegossen. Von den anderen Bakterien wurde eine Vorkultur hergestellt, indem eine für sie optimale Nährlösung beimpft und für 16 h (bei einigen langsam wachsenden Keimen auch länger) inkubiert wurde. Die Einsaatmenge für 100 ml Medium zum Plattengießen betrug 1 ml dieser Kultur.

2.9.2. Verdünnungsreihentest

Diese Testanordnung diente zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MIC).
In Reagenzgläser wurden 4,5 ml Nährlösung Nr. 5 und dazu 0,5 ml Sporensuspension pipettiert, so daß der Sporentiter der Gesamtflüssigkeit $6x10^6$ betrug.
Die Antibioticumskonzentrationen gab man in jeweils 100 µl Methanol gelöst zu.
Nach 17-stündiger Inkubation bei 37^oC erfolgte die optische Auswertung im Vergleich zum Kontrollansatz.

2.9.3. Herstellung Imacidin-resistenter Tü 57-Mutanten

Man ging dabei folgendermaßen vor:
Tü 57-Testplatten wurden mit Imacidin-getränkten Filterpapierrondellen belegt und längere Zeit inkubiert. Einzelne Kolonien, die im Hemmhof wuchsen, wurden isoliert und auf eine Petrischale mit dem Medium Nr. 5 dicht ausgestrichen; darauf legte man wieder eine Filterrondelle mit dem Antibioticum.
Diese Passage wurde mehrmals wiederholt. Die Sporen der Zellen, die zum Schluß in direkter Nachbarschaft zur Rondelle gewachsen waren, wurden zur Herstellung einer Sporensuspension verwendet. Der Titer wurde bestimmt und die entsprechende Menge in Agarplatten gegossen. Parallel dazu stellte man solche Platten mit dem Wildtyp her.
Anschließend ermittelte man durch Agardiffusionstest die Unterschiede in der Antibioticaempfindlichkeit von Wildtyp und Mutante.
Die Resistenz gegenüber Imacidin hält sich nur bei ständiger Anwesenheit des Antibioticums.

2.9.4. Versuch zur Inaktivierung von Imacidin und 1424 durch Escherichia coli, Bacillus subtilis und Gaffkya homari

Pro Bakterienart pipettierte man je 2 ml Nährlösung Nr. 7 (für Gaffkya homari Nährlösung Nr. 12) in zwei sterile Reagenzgläser und gab 200 µl einer methanolischen Antibioticumslösung hinzu, so daß Endkonzentrationen von 1 mg/ml und 0,2 mg/ml (Imacidin) sowie 2 mg/ml und 0,2 mg/ml (1424) vorlagen.Die Röhrchen wurden aus einer ca. 16 h gewachsenen Vorkultur mit je 1 Tropfen angeimpft und anschließend bei 37°C inkubiert.

Vor dem Animpfen und danach während des Wachstums entnahm man mehrmals 20 µl Flüssigkeit, die man auf eine Filterpapierrondelle gab und diese auf einer Glasplatte zum Trocknen liegen ließ. Die Rondelle wurde dann dreimal mit Methanol betropft und getrocknet, um die aufgebrachten Keime größtenteils abzutöten.
Danach wurde im Agardiffusionstest die Antibioticumsaktivität quantitativ bestimmt.

2.9.5. Wachstumskurven mit Imacidin und 1424

Mit dem Biophotometer läßt sich durch Messung der optischen Dichte das Wachstum von Zellsuspensionen verfolgen. Das Gerät der Fa. Jouan, Paris, wurde bei PORALLA (1967) und COULTAS et al. (1962) beschrieben. Es diente in diesem Fall dazu, den Einfluß der Antibiotica auf verschiedene Wachstumsphasen zu verfolgen, sowie die Wirkung von Imacidin und 1424 auf die Makromolekülsynthesen zu studieren.
Die Versuche wurden mit Tü 57 und Tü 22 als Testkeime durchgeführt. Die Einsaatdichte ist im Ergebnisteil (3.7.4.) angegeben. Die Küvetten wurden mit 7,5 ml beimpfter Nährlösung Nr. 5 gefüllt; die Antibiotica gab man in 100 µl Methanol gelöst zu.

2.9.6. Einfluß der beiden Antibiotica auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese

In diesen Versuchen, bei denen das Biophotometer benutzt wurde, sollte die Aufnahme radioaktiv markierter Vorstufen unter Antibioticumseinfluß untersucht werden. Die Experimente führte man teilweise nach SIDDHIKOL et al. (1969) durch.

Die Biophotometerküvetten wurden mit jeweils 7,2 ml Nährlösung Nr. 5 und mit 0,25 ml Sporensuspension gefüllt. Dies ergab einen Sporentiter von $1,4 \times 10^6$. Die Kulturen ließ man bei 37°C für ca. 10 bis 12 h wachsen, bis die Zellen sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Zu jeder Küvette wurden dann 100 µl (= 1 µCi) der radioaktiv markierten Vorstufe (DNS-Synthese ⟶ Thymidin, RNS-Synthese ⟶ Uracil, Proteinsynthese ⟶ Isoleucin) gegeben und sofort 200 µl Probe genommen. Nach 10 min setzte man die Antibiotica zu, deren Endkonzentration im Ergebnisteil beschrieben ist.
Zu verschiedenen Zeiten entnahm man den Kulturen jeweils 200 µl und gab diese zu 2 ml eiskalter 5 %iger Trichloressigsäure (TCA).
Nach Beendigung des Versuchs wurden die Proben über Membranfilter, Selectron Filter, Typ BA 85/1, Durchmesser 25 mm, Porengröße 0,45 µm, der Fa. Schleicher & Schüll GmbH, Dassel, abgesaugt und dreimal mit jeweils 5 ml 5 %iger TCA gewaschen.
Nach dem Trocknen der Filter an der Luft wurden sie in Plastikgläschen mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (4 g PPO auf 1 l Toluol) gegeben und für 1 min im Flüssigszintillationsspektrometer Betaszint BF 500 der Fa. Berthold, Wildbad, gezählt.

2.9.7. Einfluß von Imacidin und 1424 auf die Mureinsynthese

2.9.7.1. ^{14}C-N-Acetylglucosamin-Aufnahme in ganze Zellen

Diese Versuche wurden in 100 ml-Erlenmeyer-Kolben durchgeführt, da die Volumina der Proben im Gegensatz zu den Biophotometerversuchen vergrößert werden mußten.

Pro Ansatz wurden 20 ml der Nährlösung Nr. 5 in ein Kölbchen gefüllt und mit Tü 57-Sporensuspension beimpft, so daß der Sporentiter bei ca. $1{,}5 \times 10^6$ lag. Nach etwa 10-stündiger Inkubation bei 37°C begann der Versuch:
In jedes Kölbchen gab man 100 µl ^{14}C-N-Acetylglucosaminlösung (= 0,8 µCi) und nahm sofort eine 1 ml-Probe mit einer Eppendorf-Pipette. Den dazu benötigten Plastikspitzen war vorher ein kleines Stück abgeschnitten worden, um die Öffnung zu vergrößern.
Nach 10 min wurden 100 µl der verschiedenen Antibiotica zugesetzt und weitere Proben genommen (alle 10 min bis 90 min nach Versuchsbeginn), die in 2 ml 5 %iger TCA gefällt wurden. Die Aufarbeitung der Proben und die Bestimmung der Radioaktivität geschah wie unter 2.9.6. beschrieben.

2.9.7.2. ^{14}C-N-Acetylglucosamin-Aufnahme ins Murein

Hier wurden die Zellen nach einer modifizierten Methode von TYNECKA & WARD (1975) grob aufgeschlossen, so daß der Einbau der radioaktiv-markiert angebotenen Vorstufe ins Murein gemessen werden konnte.
Den Versuch führte man wie unter 2.9.7.1. durch.
Die Proben wurden in 2 ml eiskalter 5 %iger TCA gefällt und für 20 min im Wasserbad bei 75°C erhitzt.
Nach dem Abkühlen auf 0°C saugte man die Flüssigkeit durch lösungsmittelbeständige Glasfaserfilter (Nr. 6, 25 mm, Fa. Schleicher & Schüll GmbH, Dassel) und wusch die Filter zweimal mit 5 ml 5 %iger TCA. Danach erfolgte zweimaliges Waschen mit je 5 ml 95 %igem Äthanol und anschließend zweimaliges Waschen mit je 5 ml Äther.
Die Filter ließ man an der Luft trocknen und bestimmte die Radioaktivität wie unter 2.9.6. angegeben.

2.9.7.3. Versuch zur Anreicherung von Mureinvorstufen

Diese Experimente wurden leicht abgeändert nach den Beschreibungen von LUGTENBERG (1971), OMURA et al. (1976) und TANAKA et al. (1977) durchgeführt.
In 100 ml-Erlenmeyer-Kolben gab man 5 ml Nährlösung Nr. 5 und beimpfte mit Tü 57-Sporensuspension, so daß der Sporentiter zu Beginn bei $1x10^6$ lag. Nach 10- bis 12-stündiger Inkubation bei 37°C wurde der Versuch gestartet: In jeden Ansatz pipettierte man 100 µl ^{14}C-N-Acetylglucosaminlösung (= 1 µCi) sowie gleichzeitig das jeweilige gelöste Antibioticum.
Zum Zeitpunkt t=10 min, 30 min und 60 min nahm man je 1 ml Probe und gab sie in ein Zentrifugenröhrchen, das bis zum Ende des Versuchs im Eisbad gekühlt wurde.
Die Proben wurden folgendermaßen behandelt:
- Zentrifugation bei 4000 U/min für 10 min,
- dreimaliges Waschen mit entionisiertem Wasser und anschließender Zentrifugation,
- Aufnahme in 0,5 ml entionisiertem Wasser,
- 10-minütige Erhitzung in kochendem Wasserbad,
- Zentrifugation bei 4000 U/min für 10 min.

Vom Überstand wurden 100 µl auf Kieselgel 60 F 254-DC-Plastikfolien der Fa. E. Merck AG, Darmstadt, aufgetragen und im Laufmittelsystem Isobuttersäure/1M Ammoniak (5:3) aufsteigend chromatographiert.
Das Chromatogramm wurde anschließend in kleine Felder aufgeteilt, das Kieselgel in jedem Feld ausgekratzt und in ein Plastikgläschen mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (2.9.6.) gegeben. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte wie unter 2.9.6. beschrieben.

2.9.8. Kombinationsversuche mit anderen Antibiotica

Dazu wurden von der Fa. C.A. Greiner und Söhne GmbH & Co KG, Nürtingen, hergestellte Microtiter-Platten mit 96 U-förmigen Vertiefungen (8x12) und einem Fassungsvermögen von 300 µl verwendet. Mit einem Dispensiergerät (Dynadrop AM 83) der Fa. Dynatech Deutschland GmbH, Plochingen, konnten die Vertiefungen gleichmäßig gefüllt werden.
Es wurden 12 verschiedene Konzentrationen eines Antibioticums angesetzt und je 25 µl einer jeden Lösung in die 8 senkrechten Vertiefungen der Platte verteilt.
7 Konzentrationen von Imacidin (+ 1 Kontrolle) wurden zwölfmal in jede waagerechte Reihe gegeben (auch wieder Volumina von 25 µl).
Anschließend füllte man jede Vertiefung mit 200 µl einer angeimpften Nährlösung[1] und inkubierte die Platte für 16 h bei 37°C. Danach ließ sich die Microtiter-Platte durch Begutachtung der Trübung auswerten. Die Kontrolle (ohne Imacidin) gab an, welche Antibioticumkonzentration der minimalen Hemmkonzentration entsprach. Von diesem Wert ausgehend konnte man bestimmen, wieviel Prozent des Antibioticums noch nötig war, um in Kombination mit Imacidin das Wachstum zu hemmen.

[1] Bacillus subtilis: 0,5 ml Sporensuspension auf 100 ml Nährlösung Nr. 5.
Escherichia coli: 0,5 ml einer 16 h gewachsenen Kultur auf 100 ml Nährlösung Nr. 7.

2.9.9. Osmostabilität von Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus unter Imacidin-Einfluß

Eine etwa 16 h alte Vorkultur mit Nährlösung Nr. 6 wurde 1:4 mit frischem Medium verdünnt und je 1 ml davon in

kleine Zentrifugenröhrchen gegeben.
Zum Kontrollansatz pipettierte man 100 µl Methanol, während in das zweite Gläschen 30 µg/ml Imacidin in 100 µl Methanol gelöst kamen. Beide Röhrchen wurden für 3 h bei 37°C inkubiert. Danach zentrifugierte man die Zellen ab und nahm sie in 1 ml Saline auf. Mit diesen Suspensionen wurden Verdünnungen bis $1:10^5$ mit Saline und mit entionisiertem Wasser angesetzt, von denen nach 1-stündigem Warten jeweils 0,1 ml auf Nährmedium Nr. 6 ausplattiert wurden.
Nach einer Inkubationsdauer von 16 h wurden die entstandenen Kolonien ausgezählt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Beschreibung der Produzentenstämme Tü 1379 und Tü 1424

Die Actinomycetales-Stämme Tü 1379 und Tü 1424 stammen aus verschiedenen Bodenproben, die in der Türkei gesammelt wurden. Beide konnten der Gattung Streptomyces zugeordnet werden.
Die Beschreibung richtet sich nach der Nomenklatur und Systematik von HÜTTER (1962).

Folgende Merkmale kennzeichnen den Stamm Tü 1379:
- Die Sporen sind ellipsoid, etwa 1,7x0,7 µ groß und haben eine glatte Oberfläche.
- Die Sporenketten sind monopodial verzweigt. Die Seitenäste sind gerade oder leicht gewellt; vereinzelt treten lockere Schlingen auf.
- Das Luftmycel ist anfangs kreideweiß und im Endstadium aschgrau (cinereus).
- Auf Pepton-Eisen-Agar zeigt der Stamm keine Melaninbildung.

Auf Grund der Bestimmungsmerkmale konnte der Stamm Tü 1379 der Art Streptomyces olivaceus (Waksman) Waksman et Henrici zugeordnet werden.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (BUCHANAN & GIBBONS, 1975) zieht zur Bestimmung u.a. auch das Kriterium der C-Quellen-Verwertung heran. Diese Methode wurde hier nicht angewendet, jedoch scheint die von diesen Autoren beschriebene Art Streptomyces olivaceus mit der bei HÜTTER angeführten identisch zu sein, da in beiden Fällen die gleichen Typenstämme angegeben sind.

Tü 1379 bildet gewöhnlich auf dem Nährmedium Nr. 5 ein

lösliches, dunkelblaues Pigment, das in das Substrat diffundiert. Ohne ersichtlichen Grund kann der Farbstoff im Verlauf mehrerer Überimpfungspassagen verschwinden und genauso unvermutet wieder auftreten. Dieses Phänomen ist als stammspezifisch, nicht artspezifisch anzusehen (HÜTTER, 1962) und in diesem Fall von der Antibioticabildung völlig unabhängig.

Für den Stamm Tü 1424 gelten folgende Merkmale, die in der Arbeit von PFROMMER (1976) zusammengestellt wurden:
- Die Sporen sind ellipsoid, die Oberfläche ist glatt.
- Die Sporenketten sind gerade und monopodial verzweigt.
- Das Luftmycel ist anfangs kreideweiß, im ausgereiften Zustand zimtbraun (cinnamomeus).
- Beim Wachstum auf Pepton-Eisen-Agar bildet der Stamm kein melaninhaltiges Pigment.

Tü 1424 konnte als Streptomyces exfoliatus (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici identifiziert werden. Auch hier stimmen die Typenstämme mit den in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology zur Art Streptomyces exfoliatus angegebenen überein.

3.2. Optimierung

Schon in einer vorangegangenen Arbeit (BRECHT-FISCHER, 1975) wurde versucht, die Produktion des Antibioticums Imacidin zu verbessern. Die dort mit dem besten Resultat angegebene Nährlösung Nr. 3 konnte in neueren Versuchen von der Nährlösung Nr. 1 übertroffen werden. Da die Menge des gebildeten Antibioticums noch nicht befriedigte, versuchte man, das Medium weiter zu optimieren. Nachdem bekannt war, daß Imacidin zwei Moleküle Histidin enthält, lag der Ge-

danke nahe, es mit dieser Aminosäure als Ergänzung zur Nährlösung Nr. 1 zu versuchen.
Nr. 1 bekam einen Zusatz von jeweils 100 mg, 200 mg, 500 mg, 1 g und 10 g L-Histidin pro Liter. Bei anschließender Inkubation und Bestimmung der Antibioticumsmenge erwies sich folgendes: Die optimale Histidin-Konzentration im Medium liegt bei 500 mg/l; damit erreicht Imacidin eine Konzentration von 60 mg/l Kulturbrühe (100 l-Fermentation), was einer Produktionssteigerung von 100 % entspricht.
Bietet man dem Stamm allerdings zuviel Histidin an, verringert sich der Gehalt an aktiver Substanz drastisch.

3.2.2. von Tü 1424

Bei einer früheren Optimierung (PFROMMER, 1976) erwies sich die Nährlösung Nr. 4 als die beste. Erneute Versuche ergaben eine Steigerung der Antibioticumsmenge mit dem Medium Nr. 2. Es erwies sich, daß Tü 1424 hier auch andere Ansprüche an die Belüftung stellt. In der alten Nährlösung war die Produktion in Kolben mit 4 seitlichen Einstichen optimal, jetzt in Kolben ohne seitlichen Einstich.

Das Antibioticum 1424 enthält u.a. einige Moleküle Prolin. Da der Histidin-Zusatz bei Tü 1379 Erfolg hatte, wurde Ähnliches bei Tü 1424 nun mit Prolin versucht.
Das Medium Nr. 2 wurde mit Prolin in Mengen von 100 mg, 200 mg, 500 mg, 1 g und 10 g angereichert, worauf sich tatsächlich eine Produktionssteigerung zeigte. Bei einer Prolinkonzentration von 1 g/l erhöhte sich der Gehalt an 1424 um ca. 200 %.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm Tü 1424 nicht im größeren Maßstab fermentiert. Das Material für die biologischen Versuche stammt aus Schüttelkulturen und

wurde nur grob gereinigt; es enthielt ca. 30 % Antibioticum. Vergleichsmaterial stellte freundlicherweise P.D. Dr. A. Zeeck, Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen zur Verfügung, in dessen Arbeitsgruppe auch die Versuche zur Strukturaufklärung gemacht wurden.

3.3. Herstellung von Imacidin

3.3.1. Fermentation des Antibioticums

Um größere Mengen an Antibioticum herzustellen, wurde der Stamm im 100 l-Fermenter angezogen. Versuche im 20 l-Fermenter, der statt des Blattrührers ein Umwurfsystem hat, schlugen fehl: Tü 1379 zeigte kein Wachstum, was eventuell auf die größeren Scherkräfte in diesem System zurückzuführen ist.
Der Verlauf einer 10 l-Fermentation ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

Das Antibioticum Imacidin wird während der Wachstumsphase gebildet und ist in großen Mengen auch im Mycel zu finden. Die Aktivität im Kulturfiltrat ist zu Beginn schon relativ hoch (20 mm Hemmhofdurchmesser). Dies ist dadurch bedingt, daß bereits die Vorkultur Antibioticum produziert, dessen Menge durch das Überimpfen im Verhältnis 1:10 verdünnt wird. (Näheres dazu unter Punkt 3.7.1.) Es fällt auf, daß in den ersten 24 Stunden der Fermentation der pH-Wert stark absinkt und dann nur langsam wieder ansteigt. Da bei pH 5,1 meistens auch das Maximum der Antibioticumsproduktion erreicht ist, wurde dieser Wert als Erntekriterium genommen. Der Erntezeitpunkt kann mit dieser Methode exakter bestimmt werden als mit dem biologischen Test, bis zu dessen Auswertung 16 Stunden vergehen.

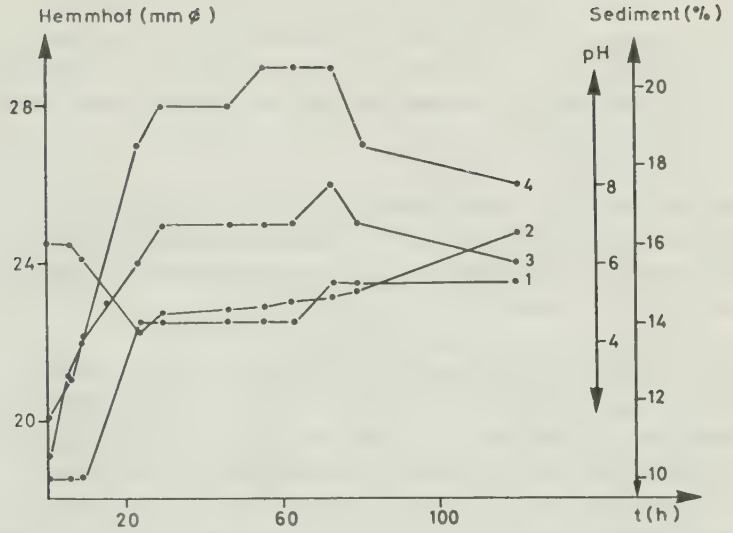


Abb. 1: Verlauf der Fermentation von Tü 1379 im 10 l-Maßstab
1: Sediment
2: pH-Wert
3: Hemmhofgröße des Kulturfiltrats auf Tü 22
4: Hemmhofgröße des Mycelextraktes auf Tü 22

Im 10 l-Fermenter wird die Kultur nach etwa 70 Stunden geerntet; im 100 l-Fermenter liegt der Erntezeitpunkt nicht wesentlich früher (ca. 65 - 70 h).

3.3.2. Aufarbeitung und Reinigung

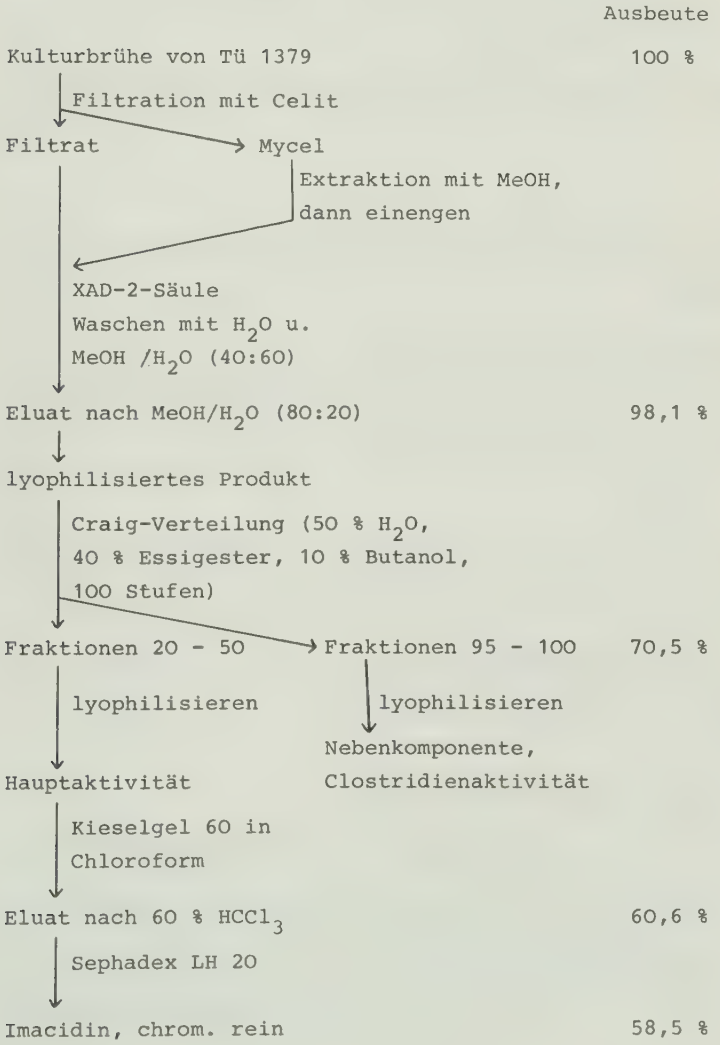
Das Antibioticum wurde aus der zum optimalen Zeitpunkt geernteten Kultur - wie unter 2.7. beschrieben - isoliert. In der Abbildung 2 ist das Aufarbeitungsschema sowie die Ausbeute angegeben.

Bei der Amberlite XAD-2-Säule spielt das Waschen mit 40 % Methanol eine große Rolle. Dies sollte mindestens mit 5 Säulenvolumina geschehen, weil dadurch viele Begleitstoffe abgetrennt werden.

Einen wichtigen Reinigungsschritt stellt die Craig-Verteilung dar. Nach dem Durchgang befindet sich in den Gefäßen 20 - 50 das Antibioticum Imacidin, während sich in den Endfraktionen lipophile Verunreinigungen anreichern, zu denen auch eine zweite aktive Substanz gehört. Dieses Antibioticum, das u.a. auf Clostridium pasteurianum wirkt, wird nur in sehr geringen Mengen produziert, so daß sein Nachweis in der Kulturflüssigkeit unmöglich ist. Es wurde versucht, die Produktion der Substanz zu optimieren, indem der Stamm in 7 verschiedenen Nährlösungen und unter variierten Bedingungen angezogen wurde, was aber nicht gelang. Bei Aufarbeitungsversuchen ergab sich, daß diese zweite Aktivität instabil ist und außerdem in mehrere Unterkomponenten aufspaltet. Auf Grund dieser Schwierigkeiten und des breiten Wirkungspektrums wegen wurde die Aktivität nicht weiter verfolgt.
Da diese zweite Substanz auch auf Streptomyces-Arten wirkt, müßte sie bei der Bilanz der Aufarbeitung bis zu ihrer Abtrennung berücksichtigt werden, was jedoch wegen der sehr geringen Konzentration in der Kulturflüssigkeit nicht geschah.

Auf der Kieselgelsäule trennt sich eine sichtbare Schmutzbande ab, die mit 100 % Chloroform zu eluieren ist;

Abb. 2: Aufarbeitungsschema von Imacidin sowie Angabe der Ausbeute beim jeweiligen Reinigungsschritt



während Imacidin erst mit Chloroform/Methanol (60:40) von der Säule kommt.

Der letzte säulenchromatographische Schritt an Sephadex LH 20 dient nur zur Nachreinigung. Das Antibioticum läuft hier mit der Methanolfront, was auf ein relativ großes Molekül schließen läßt.

Der Anreicherungsfaktor für die gesamte Aufarbeitung beträgt 284.

3.4. Chemische und physikalische Charakterisierung von Imacidin

- Dünnschichtchromatographie:
  Imacidin konnte in verschiedenen Laufmittelsystemen chromatographiert werden. Die Rf-Werte sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Rf-Werte von Imacidin bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel/Kieselgur

Fließmittelsystem	Rf-Wert
Chloroform/Methanol/25 % Ammoniak (40:60:0,25)	0,47
Chloroform/Methanol/25 % Ammoniak (40:60:0,5)	0,53
Chloroform/Methanol (25:75)	0,61
Äthylacetat/Methanol (25:75)	0,44

Die Aktivität konnte nur durch Bioautographie mit Tü 57 bzw. Tü 22 oder durch das unter 2.8.1. angegebene Sprühreagenz entdeckt werden.

- Elektrophorese:
Bei pH 7,0 wandert Imacidin nicht. Im sauren pH-Bereich läuft es um 0,5 cm zum negativen Pol, im basischen Bereich um etwa die gleiche Strecke zum positiven Pol. Dieses Verhalten deutet auf den amphoteren Charakter des Antibioticums hin.

- UV-Absorptionsspektrum:
Imacidin zeigt lediglich Endabsorption.

- Löslichkeit, Stabilität:
Das Antibioticum Imacidin ist löslich in Wasser, Methanol, Äthanol und nur schwach in Butanol; es ist unlöslich in allen unpolaren Lösungsmitteln.
Imacidin ist stabil bei sauren und neutralen pH-Werten, im alkalischen Milieu nimmt die Aktivität jedoch leicht ab.
Im lyophilisierten Zustand ist die Substanz bei -22°C sehr lange haltbar; über einen Zeitraum von ca. 3 Jahren konnte kein Aktivitätsverlust festgestellt werden. Gelöst und bei +4°C aufbewahrt bleibt die volle Aktivität wochenlang bestehen. Bei +37°C nimmt die Wirkung nach einigen Tagen ab.

3.5. Imacidin-resistente Tü 57-Mutanten

Es wurden von dem Streptomyces-Stamm Tü 57 Mutanten gesucht, die gegen das Antibioticum Imacidin resistent sind, um eine eventuell auftretende Kreuzresistenz mit anderen Antibiotica zu finden.

Unter Kreuzresistenz (ZÄHNER & MAAS, 1972) versteht man das Phänomen, daß Mikroorganismen, die gegen das Antibioticum X resistent sind, diese Eigenschaft auch beim Antibioticum Y zeigen. X und Y sind meistens verwandte Stoffe, die einen ähnlichen Wirkungsmechanismus oder den gleichen Eindringungsweg haben.
Der Nachweis einer Kreuzresistenz mit einem bekannten Antibioticum würde also einen Hinweis auf die Wirkungsweise bzw. Eindringung der unbekannten Substanz geben und damit Aussagen zur Struktur oder die Zuordnung zu einer bestimmten Gruppe erlauben.
Bei längerer Inkubation von Tü 57-Testplatten kann man in Randnähe im anfangs klaren Imacidin-Hemmhof immer einige Zellen beobachten, die trotz der relativ hohen Antibioticumkonzentration in diesem Bereich wachsen und sporulierende Kolonien bilden. Meistens aber verzögert sich das Wachstum etwas.
Mit der unter 2.9.3. geschilderten Methode lassen sich oft nach bereits 3 - 4 Überimpfungspassagen stark resistente Kolonien isolieren.
Der Resistenzfaktor (Quotient aus MIC der Mutante und MIC des Wildtyps) beträgt in diesem Fall 1000.
Sobald für die resistente Mutante Tü 57 R 1379 der Selektionsdruck aufhört (Imacidin also nicht mehr anwesend ist), selektionieren sich wieder sensible Zellen heraus, die nach mehrmaligem Überimpfen die resistenten Zellen verdrängt haben.
In der Tabelle 3 sind die Hemmhofdurchmesser für verschiedene Antibiotica bei Tü 57 und Tü 57 R 1379 angegeben.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die selektionierte Mutante nur gegen Imacidin resistent zu sein scheint. Die hier getesteten Antibiotica sind für Tü 57 R 1379 genauso wirksam wie für den Wildtyp. Die Tatsache, daß die Hemmhöfe auf den Mutantenplatten im Durchschnitt sogar 1 bis

Tab. 3: Vergleich der Hemmhofgrößen verschiedener Antibiotica im Agardiffusionstest bei Tü 57 und Tü 57 R 1379.
Die Konzentration der Antibiotica beträgt jeweils 1 mg/ml.

Antibiotica	Hemmhofdurchmesser (mm) Tü 57	Tü 57 R 1379
Bacitracin	17	16
Enduracidin	19	19
Imacidin	28	-
Penicillin G	35	36
Stenothricin	22	23
1424	23	24
Vancomycin	27	27
Angolamycin	19	20
Avilamycin	Sp	Sp
Erythromycin	29	30
Lankamycin	34	35
Kirromycin	35	36
Streptogramin	22	23
Tetracyclin	38	39
Streptolydigin	24	26
Tirandamycin	29	31
Echinomycin	28	28
Rhodomycin	12	12

2 mm größer sind, wird wahrscheinlich auf die beiden Sporensuspensionen zurückzuführen sein, die sich geringfügig in der Sporenmenge unterscheiden.
Durch Vergleich mit den anderen Antibiotica wird deutlich, daß es sich bei Tü 57 R 1379 nicht einfach um eine Mutante handelt, die stark eindringungsresistent ist.
Da keine Kreuzresistenz gefunden wurde, läßt sich auf Grund dieses Versuchs keine Aussage über Wirkungsweise bzw. Eindringungsmechanismus machen.

3.6. Struktur der beiden Antibiotica

An der Strukturaufklärung des Antibioticums Imacidin arbeitet Dr. H. Laatsch, an der Strukturaufklärung des 1424 P. Ruß, beide Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen.

Beidesmal handelt es sich um ein Acylpeptid; Imacidin enthält 10 Aminosäuren, wobei a-Thr C-terminal zu finden ist. N-terminal ist eine ß-Hydroxyfettsäure gebunden, bei der C_{12} und C_{13} überwiegen. Sehr viele Beobachtungen sprechen für das Vorhandensein eines Lactonringes, der durch Alkalibehandlung geöffnet wird, was einen großen Aktivitätsverlust bei gleicher Aminosäurezusammensetzung bedeutet.
Auf Grund des in Peptidantibiotica selten vorkommenden Histidins (Imidazolkörper!) wurde der Substanz aus Tü 1379 der Name Imacidin gegeben.
Der Peptidteil des Antibioticums 1424 besteht aus 24 Aminosäuren, der mit einer Fettsäure, meist Palmitinsäure (C_{16}), verbunden ist. Außerdem enthält diese Substanz noch einen oder mehrere Zucker.

3.7. Biologische Charakterisierung und Wirkungsweise

3.7.1. Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers im Agardiffusionstest von der Konzentration an Imacidin

In der Abbildung 3 sind die mit verschiedenen Antibioticumskonzentrationen erreichbaren Hemmhofgrößen bei zwei Streptomyces-Stämmen dargestellt.

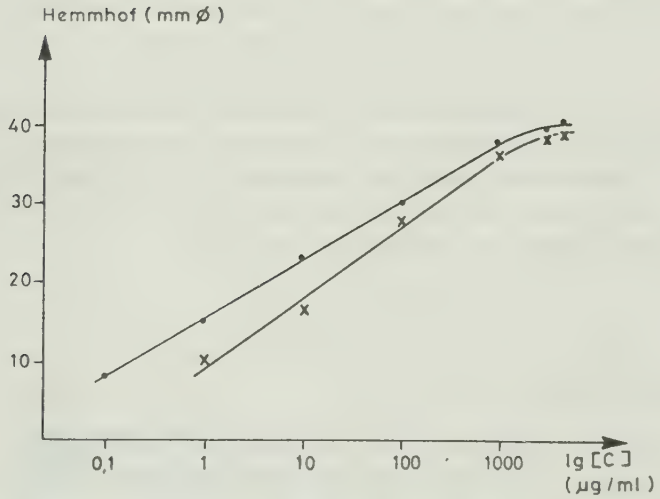


Abb. 3: Größe des Hemmhofdurchmessers im Agardiffusionstest in Abhängigkeit von der Imacidin-Konzentration

Tü 22 —•—•—

Tü 57 —×—×—

Bis zu einer Konzentration von ungefähr 1 mg/ml besteht ein lineares Verhältnis zwischen Hemmhofdurchmesser und Antibioticumgehalt der Lösung, danach flacht die Gerade ab, weil die Substanz nicht weiter in den Agar diffundieren kann.
Bei Tü 22 handelt es sich um einen sehr empfindlichen Stamm; noch bei 0,1 µg/ml Imacidin ist die antibiotische Wirkung in diesem Test nachweisbar.
Durch die geringe Steigung der Geraden bedeutet eine um 1 mm größere Hemmzone einen stark erhöhten Gehalt an Antibioticum. Als Beispiel dazu sei der in der Abb. 1 dargestellte Fermentationsverlauf erwähnt: Während des Wachstums wird der Hemmhofdurchmesser des Kulturfiltrats nur um 6 mm größer, der Gehalt an Imacidin steigt aber von 4 auf ca. 26 mg/l an.

Tü 57 zeigt ein etwas anderes Bild; bei relativ hohen Konzentrationen an Antibioticum hat er ähnliche Hemmzonenwerte. Die Nachweisgrenze für Imacidin im Agardiffusionstest liegt jedoch um eine Zehnerpotenz höher, da die Steigung im Vergleich zu Tü 22 größer ist.

3.7.2. Wirkungsspektrum

Die Antibiotica Imacidin und 1424 waren im Screening durch ihre alleinige Wirkung auf Tü 57 aufgefallen. In einem erweiterten Wirkungsspektrum wurden nicht nur diese beiden Substanzen, sondern auch das Antibioticum Stenocidin[1], sowie 1379-XIII-32 (eine mit Alkali behandelte Imacidin-Probe) getestet. Desweiteren wurden die Werte zum

[1] Herrn R. Holzbach verdanke ich Vergleichsmaterial des von ihm bearbeiteten Stenocidins.

Stenothricin aus der Literatur (ZEILER, 1974; HASENBÖHLER et al., 1974) übernommen und in der Tabelle 4 angegeben.
Die Gründe für die Gegenüberstellung dieser Substanzen sind in der Diskussion (4.1.) aufgeführt, wo auf alle fünf näher eingegangen wird.

Tab. 4: Wirkungsspektrum verschiedener Antibiotica. Die Durchführung erfolgte im Agardiffusionstest, wobei die Konzentration der 5 Substanzen jeweils 1 mg/ml betrug.
-: keine Hemmung zu beobachten
+-: Hemmhofdurchmesser ≤ 10 mm
+: Hemmhofdurchmesser ≤ 22 mm
++: Hemmhofdurchmesser ≤ 30 mm
+++: Hemmhofdurchmesser > 30 mm
n.g.: Mikroorganismus wurde nicht getestet

	Steno-thricin	Steno-cidin	1424	Ima-cidin	1379-XIII-32
BAKTERIEN					
Gram-negative aerobe Stäbchen					
Pseudomonas fluorescens	-	-	-	-	-
Pseudomonas lachrymans	-	-	-	-	-
Pseudomonas saccharophila	-	-	-	-	-
Agrobacterium tumefaciens	-	-	-	-	-
Achromobacter spec.	-	-	-	-	-
Gram-negative fakultativ anaerobe Stäbchen					
Escherichia coli K 12	-	-	-	-	-
Proteus mirabilis	-	-	-	-	-

Fortsetzung, Tab. 4

	Steno-thricin	Steno-cidin	1424	Ima-cidin	1379-XIII-32
Gram-positive Kokken					
Micrococcus luteus	+++	++	+	-	-
Micrococcus roseus	+	+	+-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-
Streptococcus faecalis	-	-	-	-	-
Leuconostoc mesenteroides	-	-	-	-	-
Gaffkya homari	n.g.	+	+	-	-
Sarcina lutea	+	-	-	-	-
Endosporen formende Stäbchen					
Bacillus brevis	-	-	-	-	-
Bacillus megaterium	-	-	-	-	-
Bacillus subtilis	-	-	-	-	-
Clostridium pasteurianum	-	-	-	-	-
Gram-positive asporogene Stäbchen					
Lactobacillus casei	-	-	-	-	-
Actinomycetes und verwandte Organismen					
Corynebacterium insidiosum	n.g.	+	+	-	-
Corynebacterium poinsettiae	+	+-	+-	-	-
Corynebacterium rathayi	+	-	-	-	-
Arthrobacter aurescens	+++	+	+	-	+-
Arthrobacter crystallo-poietes	++	+	+	-	-
Arthrobacter pascens	+++	+++	+	-	+-
Arthrobacter simplex	n.g.	-	-	-	-
Brevibacterium flavum	+	-	-	-	-
Brevibacterium linens	n.g.	+-	+-	-	-
Propionibacterium freuden-reichii	+	-	-	-	-
Mycobacterium phlei	-	-	-	-	-
Micrococcus spec.	-	-	-	-	-
Streptosporangium roseum	-	-	-	-	-
Nocardia brasiliensis	-	+	-	+++	++
Streptomyces antibioticus	-	-	+	+	+
Streptomyces collinus	n.g.	-	-	++	+
Streptomyces fradiae	n.g.	-	-	+	+

Fortsetzung Tab. 4

	Steno-thricin	Steno-cidin	1424	Ima-cidin	1379-XIII-32
Streptomyces glaucescens	-	-	-	+++	++
Streptomyces griseus	+	++	+	+++	++
Streptomyces lavendulae	n.g.	-	+-	++	+
Streptomyces prasinus	++	+++	+	++	+
Streptomyces ramulosus	n.g.	+	+	+	+
Streptomyces violaceoruber	n.g.	+-	+	+++	++
Streptomyces viridochromogenes	+++	+++	+++	++	+
PILZE					
Ascomycetes					
Botrytis cinerea	-	-	-	-	-
Candida albicans	-	-	-	-	-
Paecilomyces varioti	-	-	-	-	-
Saccharomyces cerevisiae	-	-	-	-	-
Zygomycetes					
Mucor hiemalis (+-)	-	-	-	-	-

Die Mikroorganismen sind in bestimmten Gruppen angeordnet, die Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (BUCHANAN & GIBBONS, 1975) entnommen wurden.
Es fällt auf, daß die Bakterien der fünf ersten Gruppen (mit Ausnahme einiger Gram-positiver Kokken) für die getesteten Antibiotica unempfindlich sind. Die sensiblen Keime müssen im wesentlichen im Teil 'Actinomycetes und verwandte Organismen' gesucht werden. Die hier angeführten coryneformen Bakterien sind nach dem Gesichtspunkt der ausgesprochenen Tendenz zur morphologischen

Variabilität (Keulen, kurze Stäbchen, verzweigte Formen usw.) zusammengefaßt und leiten über zur Ordnung der Actinomycetales, zu der die Streptomycetaceae gehören.

Das Antibioticum Imacidin zeigt das engste Wirkungsspektrum; es werden nur Streptomyces-Arten und der getestete Nocardia-Stamm gehemmt, während die Wirkung des Stenothricins, Stenocidins und des 1424 sich auch auf andere Mikroorganismen dieser Gruppe erstreckt.
Die Substanz 1379-XIII-32, von der man annimmt, daß der Lactonring geöffnet ist, zeigt in zwei Fällen eine Abweichung vom 'nativen' Antibioticum. Bei Streptomyceten findet man hier nur noch 8 % der ursprünglichen Aktivität.

3.7.3. Einfluß verschiedener Bakterien auf Imacidin und 1424

Ein möglicher Grund für die engen Wirkungsspektren der Antibiotica Imacidin und 1424 könnte darin bestehen, daß alle unempfindlichen Bakterien die Fähigkeit besitzen, die aktiven Substanzen in unwirksame Derivate umzuwandeln. Um dies zu untersuchen, ließ man Escherichia coli, Bacillus subtilis und Gaffkya homari in einem Medium mit Zusatz je eines der Antibiotica wachsen und kontrollierte zu verschiedenen Zeiten den Antibioticumgehalt in der Nährlösung.
Das Ergebnis ist für Imacidin und 1424 bei allen drei Bakterien gleich: Ebensowenig wie bei der unbeimpften Kontrolle ändert sich der Hemmhofdurchmesser der mit der Probe betropften Filterpapierrondelle, d.h. die Konzentration der aktiven Substanz bleibt über die Testdauer von 24 Stunden konstant.

Auf Grund dieser Resultate kann man ausschließen, daß der Resistenzmechanismus zumindest dieser drei Mikroorganismen auf dem Gebiet der Antibioticumsinaktivierung zu suchen ist.

3.7.4. Wachstumskurven und minimale Hemmkonzentrationen

In den Abbildungen 4 und 5 sind die Auswirkungen von Imacidin und 1424 auf Tü 57 dargestellt.

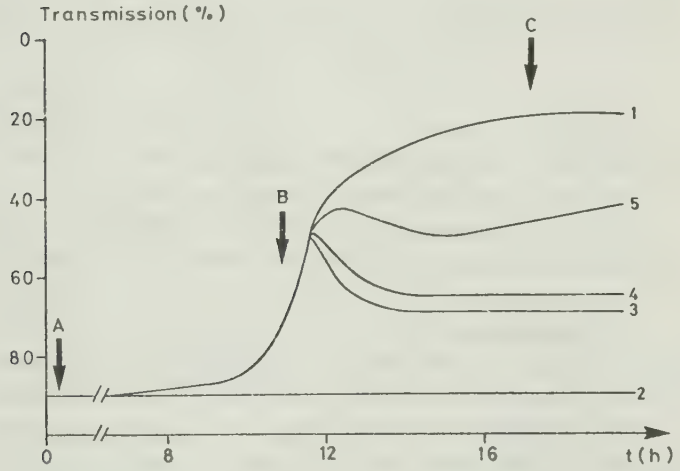


Abb. 4: Einfluß von Imacidin auf das Wachstum von Tü 57 bei Zugabe in verschiedenen Wachstumsphasen
Die Sporeneinsaatmenge beträgt $1,5 \times 10^6$. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Imacidin-Zusätze.
1: Kontrolle
10 µg/ml Imacidin (C)
2: 5 µg/ml Imacidin (A)
3: 5 µg/ml Imacidin (B)
4: 1 µg/ml Imacidin (B)
5: 0,5 µg/ml Imacidin (B)

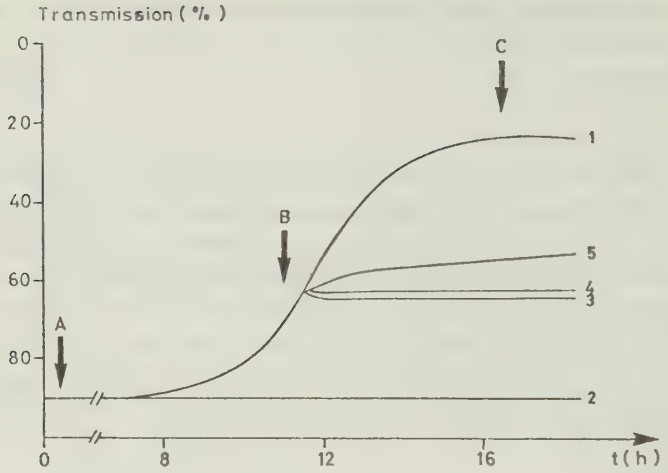


Abb. 5: Einfluß von 1424 auf das Wachstum von Tü 57 bei Zugabe in verschiedenen Wachstumsphasen
Die Sporeneinsaatmenge beträgt $1,5 \times 10^6$.
Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Antibioticumszusätze.

1: Kontrolle
14 µg/ml 1424 (C)
2: 14 µg/ml 1424 (A)
3: 14 µg/ml 1424 (B)
4: 7 µg/ml 1424 (B)
5: 0,7 µg/ml 1424 (B)

Die beiden Antibiotica Imacidin und 1424 wirken auf wachsende Zellen. Bei Zugabe in der logarithmischen Wachstumsphase dauert es ca. 30 Minuten, bis die Hemmung sichtbar wird. Die Zunahme der Transmission (Abb.4) bedeutet nicht etwa eine Lyse, sondern ist auf das verstärkte Zusammenklumpen der Zellen unter Antibioticums-

einfluß zurückzuführen. Gibt man Imacidin oder 1424 in der stationären Phase zu, so ist keine Wirkung zu beobachten.
Als minimale Hemmkonzentration für Imacidin in dieser Testanordnung sind 0,5 µg/ml anzusehen.
Obwohl das Antibioticum 1424 nicht als sauberes Material vorliegt, sind die in-vivo-Hemmwerte, wie aus Abb.5 ersichtlich, ähnlich denen des Imacidins. Die relativ starke Wirkung auf Tü 57 macht sich auch im Agardiffusionstest bemerkbar (siehe Tab. 4: Wirkungsspektrum).

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration im Verdünnungsreihentest ergab folgende Werte:

Imacidin:
Tü 57 (6×10^6 Sporen/ml) $> 0{,}2$ µg/ml $< 0{,}5$ µg/ml
Tü 22 (6×10^6 Sporen/ml) $> 0{,}1$ µg/ml $< 0{,}3$ µg/ml

1424 (PFROMMER,1976):
Tü 57 ($0{,}5 \times 10^5$ veg.Zellen/ml) $> 0{,}1$ µg/ml < 1 µg/ml

Werden die Zellen nach Antibioticumbehandlung gewaschen und auf frischem Medium ausplattiert, so beginnen sie nach einer längeren lag-Phase wieder zu wachsen.
Beide Substanzen wirken also nicht bakterizid, sondern bakteriostatisch.

3.7.5. Wirkungen auf die Makromolekülsynthesen

3.7.5.1. DNS-, RNS- und Proteinsynthese in vivo

Die Abbildungen 6 und 7 stellen die Ergebnisse der Einbauversuche von radioaktiv markiert angebotenen Vorstufen unter Einwirkung des Antibioticums Imacidin dar, wobei der Einbau in säurefällbarem Material gemessen wurde.
Die Meßwerte der einzelnen Kurven weichen etwas von der Ideallinie ab, was durch die Pelletbildung der Mikroorganismen in Flüssigkultur zu erklären ist. Dadurch kommt es bei jeder Probenahme zu kleinen Abweichungen der Zellmengen

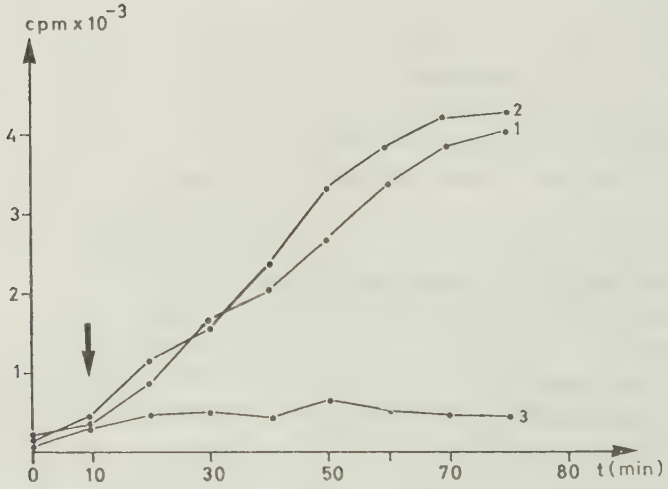


Abb. 6: Einbau von ^{14}C-Thymidin nach Zugabe von Imacidin. Testorganismus ist Tü 57. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticumszugabe.
1: Kontrolle
2: 5 µg/ml Imacidin
3: 5 µg/ml Actinomycin

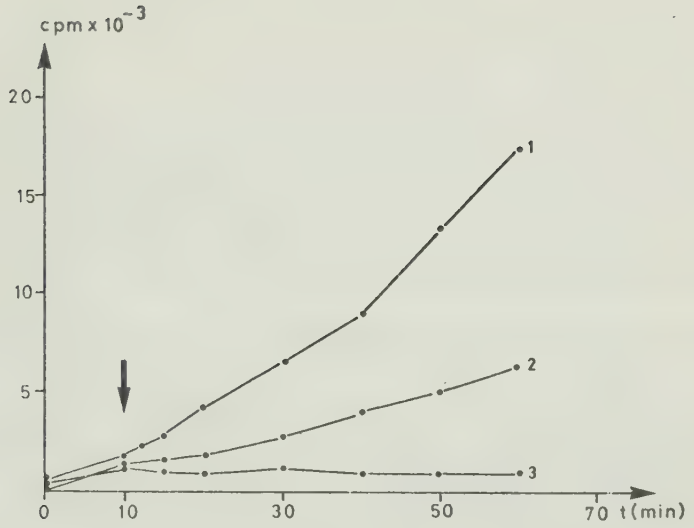


Abb. 7: Einbau von ^{14}C-Uracil nach Zugabe von Imacidin. Testorganismus ist Tü 57. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticumszugabe.
1: Kontrolle
2: 5 µg/ml Imacidin
3: 5 µg/ml Rifampicin

Trotz mehrfacher Bemühungen gelang es nicht, die Proteinsynthese unter dem Einfluß von Imacidin zu messen. Der Grund ist in der mangelhaften Aufnahme des als Vorstufe angebotenen Isoleucins zu sehen. Bei diesen Versuchen dienten nicht nur Tü 22 und Tü 57, sondern auch Tü 17 (Streptomyces griseus), Tü 27 (Streptomyces fradiae) und Tü 49 (Streptomyces glaucescens) als Testorganismen. Auch das Ausweichen auf eine andere, vorwiegend proteinogene Aminosäure, nämlich Phenylalanin, brachte keinen Erfolg.

Imacidin scheint keine Wirkung auf die DNS-Synthese zu haben, da sich der ^{14}C-Thymidin-Einbau nach der Zugabe in den gleichen Größenordnungen wie bei der Kontrolle bewegt.

Die RNS-Synthese wird von Imacidin beeinflußt, wobei es allerdings nicht zu einem Stillstand innerhalb der beobachteten Zeit kommt - wie dies beim Vergleichsantibioticum Rifampicin der Fall ist -, sondern lediglich zu einer Verlangsamung.

Eine Messung des Einbaus radioaktiv markierter Vorstufen bei Streptomyceten wurde mit 1424 nicht durchgeführt, da solche Versuche in der Arbeit von PFROMMER (1976) mit Arthrobacter pascens - einem für diese Zwecke leichter zu handhabenden Testorganismus - beschrieben sind. Die Ergebnisse,ebenso wie die des Stenothricins(ZEILER, 1974) werden mit denen des Imacidins in der Tabelle 5 verglichen.

Tab. 5: Wirkungen der Antibiotica Stenothricin, 1424 und Imacidin auf die Makromolekülsynthesen. Stenothricin, 1424: Arthrobacter pascens als Testorganismus; Imacidin: Tü 57 als Testorganismus. k.A.: keine Aussage möglich, da die angebotene Vorstufe nicht aufgenommen wird.

	Hemmung der		
	DNS-Synthese	RNS-Synthese	Protein-Synthese
Stenothricin 0,56 µg/ml	k.A.	19 %	0 %
1424 10 µg/ml	k.A.	0 %	0 %
Imacidin 5 µg/ml	0 %	61 %	k.A.

3.7.5.2. Mureinsynthese

Um einen ersten Anhaltspunkt über die Wirkung von Imacidin und 1424 auf die Mureinsynthese zu bekommen, wurde der Einbau von ^{14}C-N- Acetylglusosamin in ganze Zellen verfolgt, d.h. es wurde die Radioaktivität des Säurepräzipitats gemessen.
Diese Methode ist recht ungenau, da das angebotene N-Acetylglucosamin nicht nur in das Murein eingebaut werden kann, sondern auch an anderen Stoffwechselwegen beteiligt ist.
In der Abbildung 8 ist das Ergebnis dargestellt.

Das Resultat gab Anlaß, die Wirkungen auf die Mureinsynthese näher zu untersuchen. Hierzu wurde der unter 2.9.7.2. beschriebene Versuch durchgeführt,bei dem die Zellen aufgeschlossen werden und der ^{14}C-N-Acetylglucosamin-Einbau direkt ins Murein gemessen wird.
In der Abbildung 9 sind die Ergebnisse wiedergegeben.

Mit Vancomycin als Vergleichsantibioticum wird nach 90 Minuten der Einbau der angebotenen Vorstufe ins Murein zu 98 %, mit der gleichen Konzentration an Imacidin zu 93 % und mit 1424 zu 75 % gehemmt. Bereits in den ersten 10 Minuten ist eine drastische Herabsetzung der Einbaurate festzustellen.
Nach diesem Versuch kann man mit ziemlicher Sicherheit sagen, daß für Imacidin und 1424 die bakterielle Zellwandsynthese der Primärwirkort ist.
Es ist nicht ganz zu verstehen, weshalb ein Antibioticum mit diesem Angriffsort ein so enges Wirkungsspektrum hat, wie es in diesem Fall vorliegt. Deshalb wäre es theoretisch denkbar, daß ein Bakterium wie z.B. Staphylococcus aureus in Gegenwart einer der beiden Substanzen ebenfalls eine geringe Hemmung der Mureinsynthese zeigt,

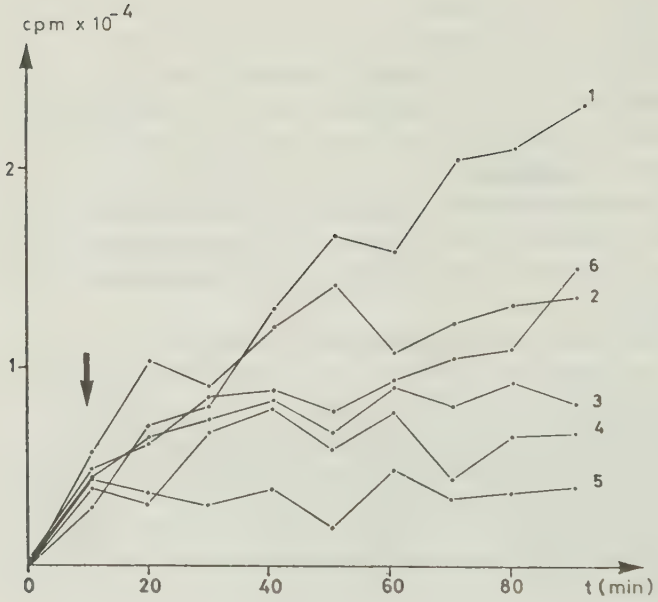


Abb. 8: Einbau von ^{14}C-N-Acetylglucosamin in ganze Zellen von Tü 57 nach Zugabe verschiedener Antibiotica.
Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticumszusätze.
1: Kontrolle
2: 5 µg/ml Penicillin G
3: 5 µg/ml Stenocidin
4: 5 µg/ml 1424
5: 5 µg/ml Imacidin
6: 1 µg/ml Imacidin

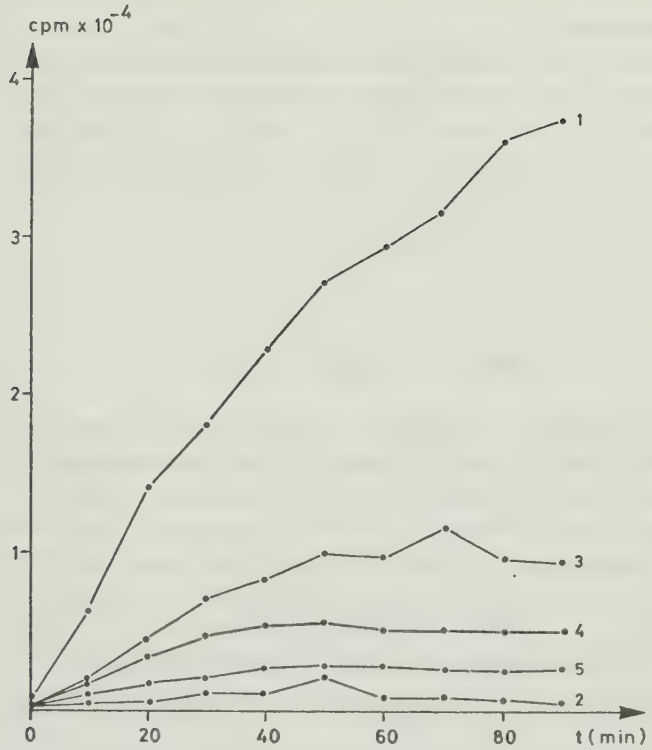


Abb. 9: Einbau von ^{14}C-N-Acetylglucosamin in das Murein von Tü 57.
Die Antibiotica wurden zum Zeitpunkt t=0 zugesetzt.
1: Kontrolle
2: 5 µg/ml Vancomycin
3: 5 µg/ml 1424
4: 1 µg/ml Imacidin
5: 5 µg/ml Imacidin

diese aber nicht ausreicht, um den Organismus sichtbar zu schädigen.
Um dieser Theorie nachzugehen, wurde der gleiche Versuch (2.9.7.2.) auch mit Staphylococcus aureus und mit Bacillus subtilis durchgeführt. Es zeigte sich, daß auch bei Konzentrationen von 20 µg/ml keine von der Kontrolle wesentlich abweichende Einbaurate von ^{14}C-N-Acetylglucosamin festzustellen war.

3.7.6. Anreicherung von Mureinvorstufen

Um die Fülle der theoretisch möglichen Wirkungsmechanismen im Bereich der Zellwandsynthese einschränken zu können, wurde versucht, ob unter Einfluß von Imacidin und 1424 eine Anreicherung der Mureinvorstufe UDP-N-Acetylmuramylpentapeptid beobachtet werden kann, was für verschiedene Antibiotica wie Vancomycin, Bacitracin (STONE et al., 1971), Gardimycin (SOMMA et al., 1977), Enduracidin (MATSUHASHI et al., 1969), Amphomycin (OMURA et al., 1977) und andere beschrieben worden ist.

Bei diesem Versuch wurden mit Antibioticum behandelte Tü 57-Zellen mehrmals gewaschen und dann hitzedenaturiert. Den Überstand der Proben fraktionierte man anschließend durch Dünnschichtchromatographie im Laufmittelsystem aus Isobuttersäure und Ammoniak und konnte danach den Gehalt an radioaktiv markiertem Murein und UDP- MurNAc(-pentapeptid) bestimmen.
Der Rf-Wert des Mureins wird mit 0,0 angegeben, der des UDP-MurNAc(-pentapeptid) mit 0,15.
In der Tabelle 6 ist ein typisches Resultat wiedergegeben.

Tab. 6: Wirkung von Imacidin, 1424, Stenocidin und Vancomycin auf die Zellwandsynthese bei Tü 57. Der cpm-Wert gibt den Gesamteinbau des ^{14}C-N-Acetylglucosamins innerhalb von 60 min wieder.

	cpm (%)	
	Murein Rf 0,0	UDP-MurNAc(-pentapeptid) Rf 0,15
Kontrolle	71958 (100)	5702 (100)
Vancomycin	2792 (3,8)	10554 (185)
Imacidin	3902 (5,4)	11260 (194)
1424	11549 (16)	3041 (53)
Stenocidin	17839 (24,8)	3180 (56)

Vancomycin wurde als Vergleichantibioticum eingesetzt, um sicherzugehen, daß der angegebene Rf-Wert tatsächlich der Lage des UDP-MurNAc(-pentapeptid) entspricht.
Im Gegensatz zur Kontrolle ist die Mureinsynthese bei allen vier Antibiotica stark herabgesetzt. Die größere Wirkung des Imacidins im Vergleich zum 1424, die schon in der Abbildung 9 zu sehen ist, wird auch hier deutlich.
Bei Vancomycin und Imacidin liegt die Mureinvorstufe etwa in der doppelten Menge vor wie beim Kontrollansatz, während keine Anreicherung beim 1424 und Stenocidin zu verzeichnen ist.

Am Rf-Wert 0,9 befindet sich eine weitere Zwischenstufe

der Mureinsynthese, GlcNAc-MurNAc(-pentapeptid)-P-P-Phospholipid: Unter Imacidin-Einfluß war dieser Wert jedesmal geringer als bei der Kontrolle.

3.7.7. Wirkung von Imacidin und 1424 in Kombination mit anderen Antibiotica

Für das Antibioticum Stenothricin wurde ein synergistischer Effekt mit anderen Zellwandantibiotica beschrieben (ZEILER, 1974; HASENBÖHLER et al., 1974), den man auf eine Doppelblockade innerhalb dieses einen Biosyntheseweges zurückführte.
Die gleiche Wirkung wird auch bei Imacidin, 1424 und Stenocidin im Kreuztest mit Tü 57 beobachtet, wobei die Kombination mit Penicillin G die günstigste zu sein scheint.
Theoretisch besteht die Möglichkeit, daß z.B. Penicillin es den Substanzen auf irgendeine Weise erleichtert, an ihren Wirkort zu gelangen. Trifft diese Annahme zu, so könnte auch eine verstärkte Kombinationswirkung bei Bakterien auftreten, die unempfindlich für Imacidin und verwandte Antibiotica sind.
Tatsächlich zeigte es sich, daß im Kreuztest auf Staphylococcus-aureus-Testplatten die Penicillinwirkung in Gegenwart von Imacidin verstärkt wird.

Auf der Suche nach einer Methode, die es erlaubt, mit vertretbarem Arbeitsaufwand und minimalem Materialeinsatz eine quantitative Aussage über das Synergismusphänomen zu machen, kam man auf das Microtiter-System. Im Flüssigmedium kann hiermit die minimale Hemmkonzentration eines Antibioticums allein und mit Zusatz einer zweiten Substanz leicht bestimmt werden.
Es eignen sich für diese Testanordnung allerdings nicht

alle Bakterien; so wächst z.B. Staphylococcus aureus auch bei längerer Inkubationsdauer nicht, was wahrscheinlich auf die relativ geringe Sauerstoffzufuhr in den Vertiefungen der Platte zurückzuführen ist. Als gut geeigneter Mikroorganismus erwies sich Bacillus subtilis, mit dem die Versuche im wesentlichen durchgeführt wurden.
Das Ergebnis einiger Kombinationsversuche ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Kombination verschiedener Antibiotica mit Imacidin bei Bacillus subtilis und Escherichia coli in Flüssigkultur.
Es ist angegeben, wieviel Prozent der ursprünglichen minimalen Hemmkonzentration in Gegenwart von 25 µg/ml Imacidin zur Hemmung benötigt wird.
n.g.: nicht getestet

	Bacillus subtilis	Escherichia coli
Penicillin G	15 - 20 %	100 %
Mecillinam	1 %	100 %
Vancomycin	1 %	100 %
Enduracidin	1 %	100 %
Actinomycin	1 %	n.g.
Tetracyclin	1 - 10 %	100 %
Streptomycin	0,5 %	100 %
Chloramphenicol	0,5 %	n.g.

Wie man sieht, tritt der Synergismus nicht nur in Zusammenhang mit Zellwandsynthesehemmstoffen auf, sondern mit jedem getesteten Antibioticum, unabhängig von dessen Wirkung.
Für Stenocidin und 1424 gilt ähnliches, wie einige vergleichende Versuche ergeben haben, nur scheint der Synergismus dabei weniger stark ausgeprägt zu sein.
Bei Gram-negativen Organismen - stellvertretend hier Escherichia coli - ist keine derartige Wirkung festzustellen.

Einschränkend muß leider gesagt werden, daß diese Beobachtungen nicht für jedes Testsystem zutreffen. Gießt man z.B. Imacidin in Bacillus-subtilis-Testplatten ein und legt mit dem zweiten Antibioticum getränkte Rondellen darauf, so ist nach entsprechender Inkubationszeit der Hemmhof höchstens um 1 bis 2 mm größer als vorher, was auf keinem Fall den Ergebnissen in Flüssigkultur entspricht. Diese Diskrepanz zwischen den beiden Testanordnungen konnte noch nicht geklärt werden.

3.7.8. Osmostabilität von Bakterien unter Imacidin-Einfluß

Das Ergebnis der Kombination von Imacidin mit verschiedenen Antibiotica war der Grund für die Versuche zur Osmostabilität von Gram-positiven Bakterien, die für Imacidin unempfindlich sind.
Vielleicht beeinflußt Imacidin irgendwie die Zusammensetzung der Zellwand, wodurch das Eindringen anderer Antibiotica erleichtert werden könnte. Dieser Vorgang könnte eventuell in einer verminderten Stabilität der Zellen in Saline und entionisiertem Wasser zum Ausdruck kommen.

Die in Gegenwart von Imacidin gewachsenen Zellen wurden gewaschen, mit entionisiertem Wasser bzw. Saline verdünnt und nach einer gewissen Wartezeit ausplattiert. Beim Auszählen der überlebenden Keime zeigte es sich, daß weder bei Bacillus subtilis noch bei Staphylococcus aureus eine Abweichung von der Kontrolle festzustellen war.
Falls die Zellwand tatsächlich durch Imacidin verändert wird, so hat dies keinen Einfluß auf die Osmostabilität der Mikroorganismen.

4. DISKUSSION

4.1. Stenothricin, Stenocidin, 1424 und Imacidin: Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Struktur und biologischem Verhalten

Die vier, alle im Fachbereich Biologie der Universität Tübingen isolierten Substanzen gehören chemisch gesehen zu den Acylpeptid-Antibiotica. Sie werden von Streptomyceten produziert - im Fall des Stenothricins und des Stenocidins sogar vom gleichen Stamm - und können deshalb schon von den zahlreichen Acylpeptid-Antibiotica, die aus Bacillus-Arten gefunden wurden (OVCHINNIKOV et al., 1966; PARKER & RATHNUM, 1973; SHOJI & KATO, 1975; SHOJI et al., 1976), abgegrenzt werden. Hierbei handelt es sich meist um relativ breit wirkende Stoffe, während Stenothricin, Stenocidin, 1424 und Imacidin durch ein ausgesprochen enges Wirkungsspektrum auffallen.
Stenothricin war 1974 der erste Vertreter dieser Gruppe. Es zeigte sich bald, daß der Produzent mehrere Spielarten dieser Substanzen herstellt, von denen das Stenocidin eine relativ gut zu erfassende Komponente ist, die sich auch reproduzieren läßt, während es heute nicht mehr gelingt, das ursprüngliche Stenothricin zu isolieren.
Bei der Bearbeitung der Antibiotica aus Tü 1424 und Tü 1379 erkannte man im Laufe der Zeit die biologische Verwandtschaft zum Stenothricin. Durch die Ergebnisse der Strukturaufklärung wurde deutlich, daß auch auf der chemischen Seite starke Ähnlichkeiten bestehen.
In der Tabelle 8 sind die Strukturelemente, soweit sie bekannt sind, aufgeführt.
Im Fall des Stenothricins stützen sich die Angaben auf die Veröffentlichungen von KÖNIG (1974) und KÖNIG et al. (1976).
Die Daten der anderen drei Substanzen sind persönliche

	Peptidteil	Acyl-rest	Zucker-Anteil	Lacton-ring
Stenothricin	L-Dpm - L-Ser - D-aThr - Sar - L-Lys - D-Ser - - L-Val - D-Cys(O_3H)	ß-Keto-Fettsäure	-	-
Stenocidin	Ala $AspNH_2$ CysS Glu Gly Ile Leu Lys Phe Pro Sar Ser_2 Thr Tyr Val	ß-Keto-Fettsäure	-	?
1424	Ala_2 ($AspNH_2$) Glu Gly_3 Ile Leu_3 Lys Phe Pro_2 Ser_3 Thr_2 Tyr Val_2	Fettsäure	+	?
Imacidin	Abu Ala_2 CysS L-His_2 L-Leu aThr Thr aThr	ß-Hydroxy-Fettsäure	-	+

Tab. 8: Strukturelemente der Antibiotica Stenothricin, Stenocidin, 1424 und Imacidin

Mitteilungen: Stenocidin (HOLZBACH, 1978), 1424 (RUß, 1978), Imacidin (LAATSCH, 1978).

Stenothricin hat mit 8 Aminosäuren den kleinsten Peptidteil, dann folgt Imacidin mit 10, Stenocidin mit 16 und 1424 mit 24 Aminosäuren. Die D- und L-Konfiguration und die vollständige Sequenz ist mit Ausnahme des Stenothricins noch nicht bekannt.
Die Mikroheterogenität vieler Antibiotica kommt auch hier zum Ausdruck, indem die aliphatischen Acylreste in ihrer Kettenlänge variieren können.
Sehr viele Antibiotica mit Peptidteil zeigen eine cyclische Struktur (BODANSZKY, 1969; KITAGAWA et al., 1977). Dies scheint zumindest auch für Imacidin zuzutreffen. Das erste Anzeichen war die hohe Alkalilabilität der Substanz; nach Alkalibehandlung zeigt Imacidin auf Streptomyces spec. nur noch 8 % der ursprünglichen Aktivität, wobei jedoch die gleichen Aminosäuren im Hydrolysat auftauchen. Dies und noch weitere Hinweise sprechen für das Vorhandensein eines Lactonringes.
Die Beobachtung der Alkalilabilität kann auch beim Stenocidin und beim 1424 gemacht werden; ob dies auch eine Cyclisierung des Moleküls bedeutet, ist noch ungewiß.
Beim Antibioticum 1424 tritt mit Sicherheit ein Zuckerbestandteil auf, was für die anderen ausgeschlossen werden kann.

Die Verwandtschaft der vier Antibiotica auf biologischer Seite wird durch verschiedene Aspekte deutlich.

- Wirkungsspektrum: Stenothricin, Stenocidin und 1424 hemmen mit wenigen Ausnahmen die gleichen Mikroorganismen. Etwas abgerückt davon erscheint Imacidin, dessen Wirkung ausschließlich auf Actinomycetales beschränkt ist.
Die relativ große systematische Nähe der empfindlichen

Bakterien zueinander scheint für eine Wirkortresistenz der unempfindlichen Keime zu sprechen, d.h. ihr potentieller Angriffsort ist so verändert, daß der Hemmstoff nicht angreifen kann (KISER et al., 1969; FRANKLIN & SNOW, 1973).
Das Auftreten der alkalibehandelten Substanz 1379-XIII-32, die noch 8 % Aktivität auf Streptomyceten hat und deren Wirkungsspektrum in zwei Fällen erweitert ist, läßt mehrere Interpretationen zu:
Es könnte sein, daß durch die Öffnung des Lactonringes das Molekül so verändert ist, daß dessen Affinität zum Wirkort bei Streptomyceten abnimmt, während sie zu dem bei Arthrobacter-Arten ansteigt.
Auf der anderen Seite ist es jedoch auch denkbar, daß die in ihrer Form vielleicht drastisch abgewandelte Substanz nun bei Actinomycetales nicht mehr so einfach ihren Angriffsort erreicht, während es erst gerade diese veränderte Form ist, die ihr Vordringen bis zum Wirkort bei Arthrobacter möglich macht.

Ein weiterer möglicher Resistenzmechanismus (BENVENISTE & DAVIES, 1973) ist die Inaktivierung des Antibioticums durch den Mikroorganismus, wie er z.B. bei ß-Lactamantibiotica gefunden wurde (CITRI & POLLOCK, 1966; SMITH et al., 1969). Weiterhin wurde diese Art der Resistenz für Chloramphenicol (SHAW, 1967; SUZUKI & OKAMOTO, 1967) und Aminoglycosidantibiotica (OKAMOTO & SUZUKI, 1965) nachgewiesen.
Durch den unter 3.7.3. beschriebenen Versuch, bei dem der Antibioticumgehalt im Medium während des Wachstums der Bakterien gemessen wurde, kann man wahrscheinlich ausschließen, daß die Resistenz für Imacidin und seine Verwandten durch Inaktivierung hervorgerufen wird. Für Aminoglycosidantibiotica konnte allerdings gezeigt werden, daß das Antibioticum im Medium unverändert bleibt, obwohl der Mikroorganismus inaktivierende Enzyme be-

sitzt (DAVIES & BENVENISTE, 1974). Als Erklärung geben die Autoren an, daß der Hemmstoff beim Eindringen in die Zellen abgewandelt und nicht, wie dies z.B. beim Chloramphenicol der Fall ist, ins Medium entlassen wird, sondern mit der Zelle verbunden bleibt und dadurch eine weitere Aufnahme des Antibioticums verhindert.

- Wachstumskurven: Alle vier Antibiotica wirken nur auf wachsende Zellen und es dauert zwischen 30 und 45 Minuten, bis sich die Hemmung in den Wachstumskurven niederschlägt. Obwohl aus den Einbauversuchen ersichtlich ist, daß die Mureinsynthese innerhalb der ersten 10 Minuten gestoppt wird, vergeht noch relativ viel Zeit, bis die Schädigung der Mikroorganismen so groß ist, daß sie sich nicht weiter vermehren können.
Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befinden und ihren Mureinsacculus nicht mehr vergrößern müssen, sind unempfindlich.
Die hier behandelten Antibiotica zeigen eine bakteriostatische und nicht eine bakterizide Wirkung, wie man es von Zellwandhemmstoffen eigentlich erwarten sollte. Auf dieses Phänomen wird im nächsten Punkt noch näher eingegangen.

4.2. Mureinstruktur und Angriffsorte Zellwand-hemmender Antibiotica

Auf Grund der in Teil 3. dargestellten Ergebnisse muß man annehmen ,daß der primäre Angriffsort der Antibiotica Imacidin, 1424 und ihrer Verwandten die bakterielle Zellwand ist. Deshalb ist es interessant, einige Aspekte im Zusammenhang mit der Zellhülle der Bakterien zu beleuchten.

Gram-positive und Gram-negative Mikroorganismen unterscheiden sich stark im Aufbau ihrer Zellhülle (COSTERTON & CHENG, 1975). Während bei Gram-positiven Bakterien auf die Cytoplasmamembran ein vielschichtiges Murein (30 - 70 % des gesamten Zellwandmaterials) folgt, dem in den meisten Fällen Teichonsäuren und/oder Teichuronsäuren und Polysaccharide aufgelagert sind (BRAUN & HANTKE, 1974), ist die Zusammensetzung bei Gram-negativen Bakterien komplexer: Innere (Cytoplasma-)Membran; eine dünne Mureinschicht (weniger als 10 % des Gesamtzellwandmaterials); äußere Membran mit Phospholipiden, Lipopolysacchariden und einem relativ hohen Proteingehalt (OSBORN et al., 1974; BRAUN, 1977).
Das Murein stellt eine gemeinsame Zellwandkomponente aller Prokaryonten dar; lediglich einige halophile Bakterien besitzen keine Mucopeptide (STOEKENIUS & ROWEN, 1967). Bei Gram-negativen Bakterien ist das Murein ziemlich einheitlich aufgebaut, wohingegen es bei Gram-positiven eine größere Variationsbreite gibt.
Die Zuckerketten, abwechselnd bestehend aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, treten fast überall gleichgebaut auf (Ausnahmen bilden lediglich einige Mycobacterium- und Nocardia-Stämme (UCHIDA & AIDA, 1977)), so daß die verschiedenen Mureintypen sich meistens in deren Quervernetzung, die sich aus kurzen Peptiden zusammensetzt, unterscheiden.
Normalerweise beginnt von der Muraminsäure ausgehend die Peptiduntereinheit mit L-Alanin, dann folgt D-Glutaminsäure, die mit ihrer γ-Carboxylgruppe an eine L-Diaminosäure gebunden ist; den Abschluß bildet D-Alanin. Die freie Aminogruppe der L-Diaminosäure wird bei der Quervernetzung mit dem D-Alanin eines anderen Peptids verbunden.
Die große Variation kann zum einen durch den Austausch einer Aminosäure und zum anderen durch unterschiedliche Quervernetzungstypen entstehen. In der Tabelle 9 sind

die Austauschmöglichkeiten in der Peptidkette angegeben.

Tab. 9: Variationen in der Peptiduntereinheit des Mureins
(Etwas verändert nach SCHLEIFER & KANDLER, 1972)
Dab: Diaminobuttersäure
Dpm: Diaminopimelinsäure
Hsr: Homoserin
HyDpm: Hydroxydiaminopimelinsäure
3-Hyg: Threo-3-Hydroxyglutaminsäure
HyLys: Hydroxylysin

Position		Austauschmöglichkeiten
	- Mur -	
	↓	
1	L-Ala	Gly, L-Ser
	↓	
2	D-Glu	3-Hyg
	↓γ	
3	m-Dpm	L-Lys, L-Orn, LL-Dpm, m-HyDpm
	↓	L-Dab, L-HyLys, NAc-L-Dab,
	↓	L-Hsr, L-Ala, L-Glu
4	D-Ala	
	↓	
5	(D-Ala)	

SCHLEIFER & KANDLER (1972) teilen die Mucopeptide nach ihrer Quervernetzung in zwei große Gruppen ein:
Gruppe A: Quervernetzung zwischen Position 3 und 4 zweier Peptiduntereinheiten. (Gebräuchlichster Typ)
Gruppe B: Vernetzung zwischen Position 2 und 4 zweier Peptiduntereinheiten. Da in diesm Fall zwei

Carboxylgruppen verbunden werden müssen, wird stets eine L- oder D-Diaminosäure dazwischengeschaltet. (Relativ seltener Typ, besonders bei coryneformen Bakterien anzutreffen.)

Seit langem schon wird versucht, die verschiedenen Mureine als Kriterium für die Taxonomie der Bakterien anzuwenden (CUMMINS & HARRIS, 1956; BRUMFITT et al., 1958), aber erst nachdem in den letzten Jahren viele Typen der Mucopeptide genau untersucht und beschrieben worden sind, erscheint dieses Vorhaben sinnvoll.
Im folgenden sollen kurz die Mureintypen einiger, im Zusammenhang mit dieser Arbeit interessanter Bakterien behandelt werden.

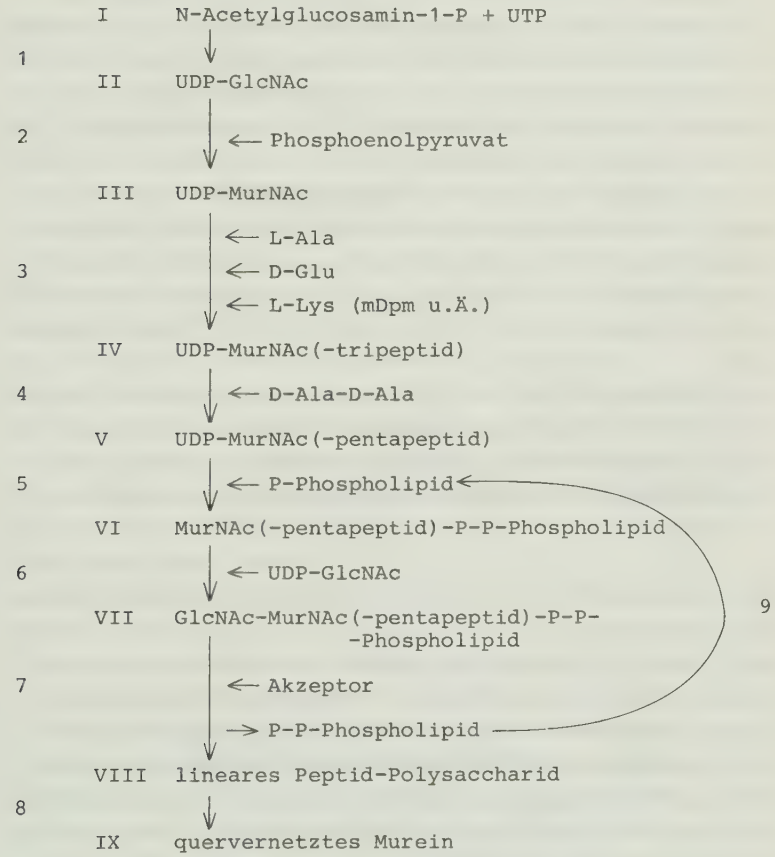
Alle Gram-negativen Bakterien scheinen an Position 3 der Peptidkette m-Dpm zu haben, von wo aus eine direkte Verknüpfung zum D-Ala der zweiten Peptiduntereinheit besteht. Bei Gram-positiven Mikroorganismen ist häufig in Position 3 ein L-Lys anzutreffen. Die Quervernetzung geschieht dann oft über mehrere Glycinreste.
Von den Actinomycetales ist die Gattung Streptomyces am besten untersucht. In allen Fällen konnte hier LL-Dpm an Position 3 gefunden werden (BECKER et al., 1965; LECHEVALIER & LECHEVALIER, 1970; LEYH-BOUILLE et al., 1970). Viele andere Actinomycetales wie Nocardia, Micromonospora, Actinoplanes usw. haben m-Dpm!
An der Quervernetzung bei Streptomyces ist stets ein Glycinrest beteiligt. Die Autoren SCHLEIFER & KANDLER (1972) betonen, daß exakt der gleiche Mureintyp bei einigen Arthrobacter-Arten entdeckt wurde und daß deshalb, zusammen mit anderen Gründen (GC-Gehalt z.B.) eine Verwandtschaft zu den LL-Dpm- enthaltenden Actinomycetales naheliegt.
Die coryneformen Bakterien, von denen viele für die Antibiotica 1424, Stenocidin und Stenothricin empfind-

lich sind, zeigen eine große Vielfalt in ihren Mucopeptiden. Hier tauchen m-Dpm, LL-Dpm und L-Lys an Position 3 mit jeweils unterschiedlichen Vernetzungsbrücken sowie die sehr seltene Quervernetzung der Gruppe B (2→ →4) auf.

Da so viele verschiedene Mureintypen bei den empfindlichen Mikroorganismen vorkommen, kann man davon ausgehen, daß die Resistenz diesen Antibiotica gegenüber nicht in der Struktur des Mucopeptids begründet ist. Dies scheint auch für Imacidin zu gelten, da es neben Streptomyceten auch Nocardia-Arten hemmt, deren Mureinaufbau genau dem von Escherichia coli entspricht.

Bei der Synthese des Mureins gibt es viele Möglichkeiten für das Eingreifen eines Antibioticums. Die Abbildung 10 zeigt die Reaktionsfolge vom ersten Zuckerbaustein bis zum quervernetzten Mucopeptid; auf die einzelnen Schritte wird bei der Vorstellung der jeweiligen Antibiotica näher eingegangen.
Die erste eigentliche Reaktion der Mureinsynthese, die vom allgemeinen Zuckermetabolismus abzweigt, ist die Bildung des UDP-GlcNAc-3-Enolpyruvyläthers aus UDP-GlcNAc und Phosphoenolpyruvat; anschließend wird dieses Produkt reduziert zu UDP-MurNAc (III). Das Enzym Pyruvyltransferase, das den ersten Teil katalysiert, wird durch das Antibioticum Fosfomycin gehemmt. Fosfomycin, ein kleines Molekül mit einem Epoxid-Ring und einer selten auftretenden C-P-Verknüpfung, bindet an das aktive Zentrum des Enzyms, d.h. es besitzt eine gewisse Struturanalogie zum Phosphoenolpyruvat, die sich jedoch nur bei der Pyruvyltransferase auswirkt. Alle anderen, Phosphoenolpyruvat-umsetzenden Enzyme werden nicht gehemmt (KAHAN et al., 1974).

Abb. 10: Vereinfachte Darstellung der Mureinsynthese



Cycloserin, ein 1952 entdecktes Antibioticum (KUROSAWA, 1952) bewirkt die Anhäufung der Zwischenstufe UDP-MurNAc-(-tripeptid) (IV). Deshalb ist eine Blockierung des nachfolgenden Schrittes (4), der Verknüpfung des Dipeptids D-Ala-D-Ala mit der bestehenden Peptidseitenkette, anzunehmen. Es erwies sich, daß Cycloserin die Bereitstellung des D-Ala-D-Ala hemmt, indem es sowohl auf die Alanin-Racemase als auch auf die Dipeptid-Synthetase wirkt (CIAK & HAHN, 1959; NEUHAUS, 1967).
Das Antibioticum zeigt eine strukturelle Ähnlichkeit mit einer bestimmten D-Alanin-Konformation und ist ein typisches Beispiel eines Antagonisten. Durch Zugabe von D-Alanin kann die Wirkung des Cycloserins wieder abgeschwächt werden, da es dann kompetitiv vom Enzym verdrängt wird.
Nach subletalen Cycloserin-Dosen kann die angereicherte Vorstufe IV in geringen Mengen in die lineare Polymerkette eingebaut werden und führt dadurch zu einem kaum quervernetzten und weniger stabilen Murein (SCHLEIFER et al., 1976).

Es gibt eine Vielzahl von Antibiotica, die in die nächsten Reaktionsschritte (5), (6) und (7) eingreifen, wobei jedoch in manchen Fällen noch Widersprüche über den genauen Mechanismus bestehen. Die meisten Schlußfolgerungen stützen sich auf die Beobachtung, daß gewisse Zwischenstufen, so z.B. das Nukleotidpentapeptid V oder intermediäre Lipide wie MurNAc(-pentapeptid)-P-P-Phospholipid (VI) und GlcNAc-MurNAc(-pentapeptid)-P-P-Phospholipid (VII) (ANDERSON et al., 1967; BRAUN & BOSCH, 1973) angereichert werden. Die in der Synthesekette als letztes angehäufte Vorstufe deutet im allgemeinen auf eine Blockierung der nächstfolgenden Reaktion hin.
Als erstes soll das Antibioticum Amphomycin sowie seine Verwandten Tsushimycin und Aspartocin erwähnt werden, die in den Jahren 1953 bis 1968 entdeckt wurden (OMURA et al.,

1976; TANAKA et al., 1977). Es handelt sich hier um Antibiotica mit einer geraden Peptidkette (7 Aminosäuren beim Amphomycin) und einem Fettsäurerest. Der Peptidteil des Tsushimycins ist mit dem des Aspartocins identisch, nur im Acylrest unterscheiden sie sich. Unter Einfluß dieser Antibiotica wird UDP-MurNAc(-pentapeptid) drastisch angehäuft, während gleichzeitig die Bildung des intermediären Lipids VI gehemmt wird. Weiterhin wird keine Auswirkung auf die Quervernetzung beobachtet. TANAKA und Mitarbeiter schließen daraus, daß der Reaktionsschritt (5), also die Verknüpfung des Nukleotidpentapeptids mit dem in der Membran befindlichen Phospholipid verhindert wird.
Eine Hemmung an diesem Punkt der Mureinsynthese wird auch vom Tunicamycin (TAMURA et al., 1976) berichtet.
Mehrere Anzeichen sprechen dafür, daß Imacidin ebenfalls in die Reihe dieser Antibiotica gehört. So konnte für Imacidin auch - im Gegensatz zum 1424 und Stenocidin - eine Anreicherung des UDP-MurNAc(-pentapeptid) beobachtet werden und außerdem scheint sich kein intermediäres Lipid anzuhäufen (HAMMES, 1977).
Zwei mögliche Schlußfolgerungen sind aus diesem Ergebnis abzuleiten:

1) Die Reaktion (5) wird direkt gehemmt oder
2) das Antibioticum beeinflußt die Bereitstellung des P-Phospholipids, ein Mechanismus, der auch für Bacitracin beschrieben wurde (siehe weiter unten).

Welche dieser beiden Möglichkeiten der Realität am nächsten kommt, kann noch nicht entschieden werden.

Bis jetzt ist nur ein Antibioticum bekannt, das den Schritt (6) inhibieren soll und zwar Enduracidin (ASAI et al., 1968; TSUCHIYA & TAKEUCHI, 1968), bei dem es sich um ein Polypeptid-Antibioticum mit einer Lipidkomponente handelt. MATSUHASHI et al. (1969) berichten, daß nach Enduracidin-Zugabe die Zwischenstufe VI,

MurNAc(-pentapeptid)-P-P-Phospholipid, angereichert wird, woraus auf eine Hemmung der Addition von N-Acetylglucosamin geschlossen werden kann (TANAKA et al., 1977). Andere Autoren (LINNETT & STROMINGER, 1973; SOMMA et al., 1977) rechnen jedoch Enduracidin mit zu der größeren Gruppe von Substanzen, die in die Reaktion (7) eingreifen, bei der die Disaccharideinheit vom Phospholipid freigesetzt und auf einen Akzeptor (wahrscheinlich gleichzusetzen mit der wachsenden linearen Polymerkette) übertragen wird.

Für diese Antibiotica gilt, daß sie alle eine Anhäufung von UDP-MurNAc(-pentapeptid) sowie der intermediären Lipide VI und VII bewirken und in einigen Fällen hat man schon recht exakte Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus.

Die genauen chemischen Strukturen von Vancomycin, Ristomycin, Ristocetin und Actinoidin, die eine ähnliche Wirkungsweise haben, sind noch nicht bekannt. Es wurden u.a. mehrere Zucker, phenolische Komponenten und Peptidteile gefunden (LOMAKINA et al., 1968; FEHLNER et al., 1972). Antibiotica der Vancomycin-Gruppe adsorbieren an die Zellen und können durch einfaches Waschen nicht wieder entfernt werden. Dieses Phänomen wird durch eine spezifische Bindung an Substanzen mit endständigem D-Alanyl-D-Alanin verursacht, d.h. es kommt zu Komplexen mit den verschiedenen Vorstufen des Mureins (PERKINS & NIETO, 1974), wodurch schließlich die Übertragung des Disaccharids auf den Akzeptor verhindert wird (LINNETT & STROMINGER, 1973).

Diumycin, Moenomycin, Prasinomycin, Macarbomycin und Janiemycin bilden eine Antibiotica-Gruppe, die neben einem Zucker- oder Polypeptidteil noch Lipide und Phosphat enthalten (BROWN et al., 1974). Einen Grund für die Anhäufung des intermediären Lipids VII sehen LINNETT & STROMINGER (1973) in dem eigenen Lipidteil der Antibiotica, der vom C_{25}-Isoprenylalkohol abgeleitet

werden kann. Vielleicht fungieren sie deshalb als Analogon zum C_{55}-Phospholipid in der Membran.
Der Reaktionsschritt (9) dient der Regenerierung des P-Phospholipids aus dem C_{55}-Isoprenylpyrophosphat, das bei der Übertragung des GlcNAc-MurNAc(-pentapeptid) auf die wachsende Polymerkette frei wird. 1967 konnten SIEWERT & STROMINGER zeigen, daß diese Reaktion spezifisch vom Polypeptidantibioticum Bacitracin gehemmt wird. In Gegenwart von Bacitracin kommt es zu einer Anreicherung von UDP-N-Acetylmuramylpentapeptid (V) und von P-P-Phospholipid. Inzwischen ist bekannt, daß Bacitracin einen Komplex mit dem P-P-Phospholipid bildet (wozu ein divalentes Kation benötigt wird), der die Pyrophosphatgruppe vor dem Angriff verschiedener Phosphatasen schützt (STONE & STROMINGER, 1971; STORM, 1974).

Der letzte Schritt der Mureinsynthese, die Quervernetzung, bewirkt erst die Unlöslichkeit und Starrheit des fertigen Mucopeptids. Diese Reaktion wird durch Penicilline und Cephalosporine gehemmt.
Die eigentliche Verknüpfung der beiden Peptidunterein-heiten wird durch die Transpeptidase katalysiert, ein Enzym, das hochsensitiv für Penicillin ist. Dies gilt auch für die DD-Carboxypeptidase, die von der Pentapeptid-einheit ein D-Alanin abspaltet. Ein drittes, Penicillin-sensitives Enzym ist die Endopeptidase, die beim quer-vernetzten Murein die Bindung zwischen zwei Peptidseiten-ketten aufspaltet; alle drei Enzyme binden irreversibel ß-Lactamantibiotica (BLUMBERG & STROMINGER, 1974).
Wie man inzwischen weiß, gibt es zwei mögliche Richtungen, in denen die Transpeptidierung ablaufen kann:
In Bacillus licheniformis fungieren die wachsende Peptid-Polysaccharid-Kette als Carboxyldonor (ein D-Ala wird abgespalten) und das schon bestehende Mucopeptid als Aminoakzeptor (WARD & PERKINS, 1973). Spaltet die DD-Carboxypeptidase von der wachsenden Kette D-Ala-Reste

ab, so wird eine weitere Quervernetzung verhindert.
In Gaffkya homari sind die Verhältnisse gerade umgekehrt. Das bestehende Murein stellt den Carboxyldonor dar und Tetrapeptiduntereinheiten der wachsenden Kette dienen als Akzeptorgruppen für die Transpeptidierung. Ein früheres Eingreifen der DD-Carboxypeptidase, die aus den Pentapeptiden Tetrapeptide macht, ist unbedingt erforderlich (HAMMES & KANDLER, 1976).
Diese beiden Systeme sind sehr übersichtlich in einem Artikel von GHUYSEN (1977a) nebeneinandergestellt.
Bei Bacillus licheniformis ist die Transpeptidase das wichtigere Enzym; eine spezifische Hemmung der DD-Carboxypeptidase bedeutet deshalb nicht den Zelltod.
Bei Gaffkya homari dagegen hat die Hemmung der DD-Carboxypeptidase durch ß-Lactamantibiotica einen Stillstand der Transpeptidierungsreaktion - ohne direkten Einfluß des Penicillins auf die Transpeptidase selber - zur Folge (HAMMES, 1976).
Man sieht an diesem Beispiel, daß das gleiche Antibioticum in verschiedenen Bakterien unterschiedliche Hauptangriffspunkte haben kann (GHUYSEN, 1977b). Das sensitive Enzym des Bakteriums A kann beim Bakterium B relativ resistent sein. Im Fall des Penicillins wird dies in vivo nicht deutlich, da ein zweites Enzym im Vergleich zum ersten gerade die reziproke Sensitivität besitzt.

Die unterschiedliche Empfindlichkeit eines Enzyms kann auch der Grund für das enge Wirkungsspektrum der Antibiotica Imacidin, 1424, Stenocidin und Stenothricin sein. Ebenso ist es möglich, daß in resistenten Bakterien die potentiell hemmbare Reaktion durch mehrere Isoenzyme katalysiert wird. Fällt eines dieser Enzyme nach Zugabe von Imacidin aus, so bedeutet dies keinen großen Verlust für die Zelle, da die übrigen Isoenzyme die Funktion mitübernehmen. In anderen Mikroorganismen läge dann nur eine empfindliche Version des Enzyms vor.

Gaffkya homari wird durch Imacidin in vivo nicht gehemmt, ein zellfreies System aus diesem Organismus ist dagegen empfindlich, wobei allerdings etwas erhöhte Konzentrationen eingesetzt werden müssen (HAMMES, 1977). Dieses Verhalten könnte zum einen durch Eindringungsresistenz des intakten Mikroorganismus zu erklären sein, zum anderen aber auch durch eine relativ unspezifische Empfindlichkeit des Enzymsystems dieses Bakteriums, die in vivo nicht recht zum Ausdruck kommt.
Für Imacidin konnte der mögliche Angriffspunkt innerhalb der Zellwandsynthese eingekreist werden, nämlich die Übertragung von UDP-MurNAc(-pentapeptid) auf den Lipidcarrier in der Membran; für die Antibiotica 1424 und Stenocidin dagegen bleibt noch vieles ungeklärt. Besonders auffallend ist die Tatsache, daß beide Substanzen keine Anhäufung von UDP-MurNAc(-pentapeptid) bewirken. Alle Antibiotica (auch Penicilline und Cephalosporine), die von diesem Zwischenprodukt an im weiteren Verlauf der Mureinsynthese eingreifen, führen zu dessen Anreicherung. Deshalb könnte man vielleicht schließen, daß 1424 und Stenocidin die Zellwandsynthese an einem frühen Punkt hemmen; weitere Hinweise dazu gibt es allerdings bis jetzt noch nicht.

Ein ungewöhnlicher Aspekt im Zusammenhang mit den Substanzen Imacidin, 1424, Stenocidin und Stenothricin ist die fehlende bakterizide Wirkung. Alle bekannten Zellwandantibiotica führen zur Lyse der Bakterien, so daß man lange Zeit glaubte, die Lyse sei eine notwendige Konsequenz der Hemmung der Zellwandsynthese.
Inzwischen weiß man, daß für den komplexen Vorgang des Zelltods die Kooperation zwischen Zellwandsynthesehemmstoffen und speziellen bakteriellen Enzymen, den Autolysinen, nötig ist (TOMASZ et al., 1970; SABATH et al., 1977). Diese Autolysine spielen wahrscheinlich eine Rolle im normalen Zellwachstum, indem sie gewisse Bindungen des Mureins aufspalten und so den Einbau neuer Disaccharid-Einheiten erlauben. Es wäre möglich, daß

sich ihre zerstörerische Aktivität nur in Abwesenheit von Zellwandvorstufen (d.h. nach Gabe von Zellwandantibiotica) auswirkt (TOMASZ, 1974).
Weshalb die oben genannten Antibiotica nicht zur Lyse führen, ob etwa das Autolysin-System in den empfindlichen Bakterien nicht genügend entwickelt ist oder ob andere Gründe ausschlaggebend sind, kann noch nicht entschieden werden.

4.3. Überlegungen zum Synergismusphänomen

Unter dem Begriff Synergismus versteht man die Tatsache, daß zwei Substanzen sich gegenseitig fördern und zusammen eine größere Wirkung haben als die Summe der beiden Einzelwirkungen (JAWETZ, 1967).

Es ist eindeutig, daß es sich bei den Beobachtungen mit Imacidin (3.7.7.) um Synergismus handelt, da Imacidin allein keinen Einfluß auf den Testorganismus zeigt, und deshalb keine Addition zweier Wirkungen vorliegen kann. Für eine synergistische antimikrobielle Aktivität zweier Stoffe gibt es vier mögliche Mechanismen (LENG et al., 1975):

a) Allosterische Modifikation der Rezeptorstelle der Substanz X durch die Substanz Y, so daß die Affinität von X zum Rezeptor größer wird.
b) Beide Substanzen hemmen verschiedene Schritte innerhalb eines Biosyntheseweges.
c) Eliminierung eines Inhibitors von X durch die Substanz Y.
d) Zunahme des Transports von X zu seinem Wirkort durch die Substanz Y.

Wenn man die mit Imacidin erreichte synergistische Wir-

kung mit anderen Antibiotica einem dieser vier Mechanismen zuordnen soll, so ergibt sich folgendes:
Die Möglichkeit a fällt aus, da es sich hier um eine sehr spezifische Beeinflussung handelt, die wohl unmöglich bei mehreren Antibiotica gleichermaßen auftreten kann.
Die unter b angegebene Wirkungsweise trifft nicht zu, da die 'Antibioticapartner' ganz verschiedene Makromolekülsynthesen hemmen. Die Möglichkeit c scheidet ebenfalls aus, denn dies ist - ähnlich wie bei a - eine sehr spezifische Reaktion.
Es bleibt also nur der Mechanismus d, bei der eine Substanz der anderen den Transport zu ihrem Angriffsort erleichtert (COSTERTON, 1977). Dies würde bedeuten, daß Imacidin seinem jeweiligen Partner eine bessere Aufnahme in die Zelle ermöglicht. Wie dies bei Gram-positiven Bakterien vor sich gehen soll, bei denen die Mureinschicht (wo Imacidin mit seiner Wirkung ansetzt) eigentlich kein Hindernis für die meisten hydrophilen und lipophilen Antibiotica darstellt (BRAUN, 1977), ist ungeklärt.
Es muß noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die Kombination verschiedener Antibiotica mit Imacidin nur in Flüssigkultur einen Synergismus dieses Ausmaßes zeigt. Bei solchen Untersuchungen kommt es besonders darauf an, die richtigen Bedingungen zu wählen. So können selbst innerhalb eines Testsystems Variationen in der Substanzkonzentration, Inkubationszeit, Impfmenge, Impfalter und anderer Größen zu wesentlich veränderten Ergebnissen führen (JAWETZ, 1967).

4.4. Ausblicke

Die in dieser Arbeit behandelten Antibiotica Imacidin und 1424 erscheinen aus mehreren Gesichtspunkten interessant und rechtfertigen eine weitere Bearbeitung.

Beim Vergleich mit anderen Zellwandhemmstoffen zeigte sich, daß Imåcidin wahrscheinlich einen Schritt im Zusammenhang mit der Übertragung des UDP-MurNAc(-pentapeptid) auf den Lipidcarrier hemmt. Dies ist eine Reaktion, von der noch nicht alle Einzelheiten bekannt sind, ebenso wie es bisher nur ganz wenige Antibiotica gibt, die hier eingreifen (Amphomycin eventuell bei der Translokation, Bacitracin bei der Bereitstellung des Phospholipids). Eine Aufklärung des Wirkungsmechanismus würde deshalb aller Wahrscheinlichkeit nach das heutige Bild von der Mureinsynthese ein bißchen weiter vervollständigen. Das gleiche gilt für die Substanz 1424 (und auch für Stenocidin), von der man noch keine rechte Vorstellung über ihren Angriffspunkt innerhalb der Zellwandsynthese hat.

Von besonderem Interesse ist Imacidin wegen seines Synergismus mit anderen Antibiotica. Sollte sich dieses Verhalten in Tierversuchen bestätigen lassen, so eröffnen sich große Möglichkeiten. Wenn auch die Toxizitätsuntersuchungen positiv verlaufen (eine Gewebstoxizität konnte bisher nicht festgestellt werden), ließe sich Imacidin gut mit anderen medizinisch eingesetzten Antibiotica kombinieren. Toxische Antibiotica, auf die man in manchen Fällen kaum verzichten kann wie z.B. Streptomycin als Tuberkulostatikum, das zu einer Schädigung des 8. Hirnnerven führt (KUSCHINSKY & LÜLLMANN, 1972), könnten mit Imacidin zusammen in weit geringerer Dosierung gegeben werden.

Wenn es gelingt, die exakten Bedingungen, unter denen das Synergismusphänomen auftritt, herauszufinden und die Versuche zu standardisieren, kann Imacidin auch im Screening nach neuen Substanzen eingesetzt werden. Auf Testplatten,die mit Imacidin-Zusatz hergestellt wurden, müßten Aktivitäten zu erkennen sein, die normalerweise

infolge ihrer geringen Menge oder Aktivität nicht gefunden würden. Hier ist es natürlich unbedingt notwendig, bekannte Substanzen schnell ausschließen zu können. Umgekehrt ist denkbar, daß subletale Dosen eines bekannten Antibioticums in Agartestplatten eingegossen werden und man mit dieser Methode ähnliche potenzierende Stoffe wie Imacidin findet.

Der Streptomyceten-Stamm Tü 1379 läßt sich nach den bisherigen Erfahrungen ohne größere Schwierigkeiten fermentieren und scheint - was noch wichtiger ist - nicht eine ganze Palette ähnlicher Peptidantibiotica zu produzieren, wie dies z.B. beim Stenothricin/Stenocidin-Produzenten der Fall ist.
Durch diese relativ einfache Handhabung des Stammes sollte die Materialbereitstellung von Imacidin zur weiteren Bearbeitung keine Probleme aufwerfen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Kulturen des Stammes Streptomyces olivaceus wurde ein neues Antibioticum, Imacidin, isoliert.
Die biologische Charakterisierung sowie die Versuche zur Wirkungsweise erfolgten parallel auch mit der Substanz 1424 aus Streptomyces exfoliatus.

Beide Antibiotica haben ein enges Wirkungsspektrum, hemmen nur wachsende Keime und zeigen keine bakterizide Wirkung. Die minimalen Hemmkonzentrationen liegen für beide Stoffe im Bereich von 0,5 µg/ml.

Es konnte nachgewiesen werden, daß für Imacidin und 1424 die bakterielle Zellwandsynthese der Hauptangriffspunkt ist. Der durch Imacidin hemmbare Schritt innerhalb der Mureinsynthese konnte näher angegeben werden, während das Eingreifen des 1424 noch unklar ist.

Unter bestimmten Versuchsbedingungen ist ein starker Synergismus zwischen Imacidin und anderen Antibiotica festzustellen, der in abgeschwächter Form auch mit der Substanz 1424 zu beobachten ist.

Die zwei Antibiotica gehören chemisch gesehen in die gleiche Gruppe. Beide bestehen aus einem Peptidteil unterschiedlicher Größe und einem Acylrest. 1424 weist zudem noch mindestens einen Zucker auf.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSON, J.S., M. MATSUHASHI, M. HASKIN & J.L. STROMINGER: Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. II. Phospholipid carriers in the reaction sequence. J. Biol. Chem. 242, 3180 - 3184 (1967)

ASAI, M., M. MUROI, N. SUGITA, H. KAWASHIMA, K. MIZUNO & A. MIYAKI: Enduracidin, a new antibiotic. II. Isolation and characterisation. J. Antibiot. 23, 138 - 140 (1968)

BECKER, B., M.P. LECHEVALIER & H.A. LECHEVALIER: Chemical compositions of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol. 13, 236 - 243 (1965)

BENVENISTE, R. & J. DAVIES: Mechanism of antibiotic resistance in bacteria. Annu. Rev. Biochem. 42, 471 - 478 (1973)

BLUMBERG, P.M. & J.L. STROMINGER: Interaction of Penicillin with the bacterial cell-wall. Penicillin-binding proteins and Penicillin-sensitive enzymes. Bac. Rev. 38, 291 - 335 (1974)

BODANSZKY, M. & D. PERLMAN: Peptide antibiotics. Science 163, 352 - 358 (1969)

BRECHT-FISCHER, A: Isolierung eines Antibioticums aus Streptomyces olivaceus sowie erste Untersuchungen zur Charakterisierung und zur Wirkungsweise. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1975)

BRAUN, V.: Membranpermeation und Antibiotica-Resistenz bei Bakterien. Naturwissenschaften 64, 126 - 132 (1977)

BRAUN, V. & V. BOSCH: In vivo biosynthesis of murein-lipoprotein of outer membrane of E. coli. FEBS-Letters 34, 302 - 306 (1973)

Braun, V. & K. HANTKE: Biochemistry of bacterial cell envelopes. Annu. Rev. Biochem. 43, 89 - 121 (1974)

BROWN, W.E., V. SEINEROVA, W.M. CHAN & A.J. LASKIN: Inhibition of cell-wall synthesis by the antibiotics Diumycin and Janiemycin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 399 - 405 (1974)

BRUMFITT, W., A.C. WARDLAW & J.T.PARK: Developement of lysozyme-resistance in Micrococcus lysodeikticus and its association with an increased O-acetyl content of the cell wall. Nature (London) 181, 1783 - 1784 (1958)

BUCHANAN, R.E. & N.E. GIBBONS: Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology. 8th edition. The Williams & Wilkins Company, Baltimore (1975)

CIAK, J. & F.E. HAHN: Mechanism of action of antibiotics. II. Studies on the modes of action of Cycloserine and its L-stereoisomer. Antibiot. Chemotherapy 9, 47 - 54 (1959)

CITRI, N. & M.R. POLLOCK: The biochemistry and functions of ß-lactamase (penicillinase). Advances Enzym. 28, 237 - 239 (1966)

CORONELLI, C., G. TAMONI & G.C. LANCINI: Gardimycin, a new antibiotic from Actinoplanes. J. Antibiot. 29, 507 - 510 (1976)

COSTERTON, J.W.: Cell envelope as a barrier to antibiotics. Microbiology, 151 - 157 (1977)

COSTERTON, J.W. & K.J. CHENG: Thr role of the bacterial cell envelope in antibiotic resistance. J. Antimicro. Chemotherapy 1, 363 - 377 (1975)

COULTAS, M.K. & D.J. HUTCHINSON: Metabolism of resistent mutants of Streptococcus faecalis. IV. Use of a biophotometer in groth-curve studies. J. Bacteriol. 84, 393 - 401 (1962)

CUMMINS, C.S. & H. HARRIS: Studies on the cell-wall composition and taxonomy of actinomycetales and related groups. J. Gen. Microbiol. 18, 173 - 189 (1958)

DAVIES, J.E. & R.E. BENVENISTE: Enzymes that inactivate antibiotics in transit to their targets. Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 130 - 136 (1974)

FEHLNER, J.R.,R.E.J. HUTCHINSON, D.S. TARBELL & J.R. SCHENCK: Structure of Ristocetin A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2420 - 2421 (1972)

FRANKLIN, T.J. & G.A. SNOW: Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe. Springer Verlag Berlin.Heidelberg.New York 1973

GHUYSEN, J.M.: The role of the Penicillin target from 1965 untill today. J. Gen. Microbiol. 101, 13 - 34 (1977a)

GHUYSEN, J.M.: Le recepteur de la penicilline chez les bacteries. Bull. Acad. Med. Bel. 132, 101 - 108 (1977b)

GHUYSEN, J.M., M. LEYH-BOUILLE, J.M. FRERE, J. DUSART, A. MARQUET, H.R. PERKINS & M. NIETO: The Penicillin receptor in Streptomyces. Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 236 - 268 (1974)

HAMMES, W.P.: Biosynthesis of peptidoglycan in Gaffkya homari: The mode of action of Penicillin G and Mecillinam. Eur. J. Biochem. 70, 107 - 113 (1976)

HAMMES, W.P.: Persönliche Mitteilung, Botanisches Institut der Universität München (1977)

HAMMES, W.P. & O. KANDLER: Biosynthesis of peptidoglycan in Gaffkya homari: The incorporation of peptidoglycan into the cell wall and the direction of transpeptidation. Eur. J. Biochem. 70, 97 - 106 (1976)

HASENBÖHLER, A., H. KNEIFEL, W.A. KÖNIG, H. ZÄHNER & H.J. ZEILER: 134. Mitteilung: Stenothricin, ein neuer Hemmstoff der bakteriellen Zellwandsynthese. Arch. Microbiol. 99, 307 - 321 (1974)

HOLZBACH, R.: Persönliche Mitteilung. Institut für organische Chemie der Universität Tübingen (1978)

HOPWOOD, D.A. & M.J. MERRICK: Genetics of antibiotic production. Bacteriol. Rev. 41, 595 - 635 (1977)

HÜTTER, R.: Systematik der Streptomyceten. Bibl. Microbiol. 6., Basel: Karger 1967

JAWETZ, E.: Combined antibiotic action: some definitions and correlations between laboratory and clinical results. Antimicrob. Agents Chemother., 203 - 209 (1967)

KAHAN, F.M., J.S. KAHAN, P.J. CASSIDY & H. KROPP: The mechanism of action of Fosfomycin (Phosphonomycin). Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 364 - 386 (1974)

KING, T.P. & L.C. CRAIG: Countercurrent distribution. Meth. Biochem. Anal. 10, 201 - 228 (1962)

KIRST, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis. Dissertation Universität Tübingen (1971)

KISER, J.S., G.O. GALE & G.A. KEMP: Resistance to antimicrobial agents. Adv. Appl. Microbiol. 11, 77 - 99 (1969)

KITAGAWA, T., T. MIURA & H. TANIYAMA: Roles of cyclic structure and dehydro-form amino acid residue in a peptide antibiotic. J. Biochem. 81, 1759 - 1767 (1977)

KÖNIG, W.A.: Identifizierung der ß-Ketoacylreste in Stenothricin, einem neuen Peptid-Antibiotikum. Z. Naturforsch. 29b, 679 - 682 (1974)

KÖNIG, W.A., C. ENGELFRIED, H. HAGENMAIER & H. KNEIFEL: Structur des Peptidantibiotikums Stenothricin. Liebigs Ann. Chem., 2011 - 2020 (1976)

KUSCHINSKY, G. & H. LÜLLMANN: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1972

LAATSCH, H.: Persönliche Mitteilung. Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen (1978)

LECHEVALIER, M.P. & H. LECHEVALIER: Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Int. J. Syst. Bacteriol. 20, 435 - 443 (1970)

LENG, B., B.R. MEYERS, S.Z. HIRSCHMANN & G.T. KEUSCH: Susceptibilities of Gram-negative bacteria to combinations of antimicrobial agents in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 8, 164 - 171 (1975)

LEYH-BOUILLE, M., R. BONALY, J.M. GHUYSEN, R. TINELLI & D. TIPPER: LL-Diaminopimelic acid containing peptidoglycans in walls of Streptomyces sp. and of Clostridium perfringens (Type A). Biochemistry 9, 2944 - 2952 (1970)

LINNETT, P.E. & J.L. STROMINGER: Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. Antimicrob. Agents Chemother. 4, 231 - 236 (1973)

LUGTENBERG, E.J.J., A. van SCHIJNDEL-van DAM & T.H.M. van BELLEGEM: In vivo and in vitro action of new antibiotics interfering with the utilization of N-Acetyl-Glucosamin-N-Acetyl- Muramyl-Pentapeptide. J. Bacteriol. 108, 20 - 29 (1971)

LUMAKINA, N.N., L.I. MURAVYEVA & M. PUSKAS: Ristomycin A and B. Structure of the carbohydrate moiety of the molecule. Antibiotiki 13, 867 - 870 (1968)

MATSUHASHI, M., I. OHARA & Y. YOSHIYAMA: Inhibition of the bacterial cell-wall synthesis in vitro by Enduracidin, a new polypeptide antibiotic. Agr. Biol. Chem. 33, 134 - 137 (1969)

NEUHAUS, F.C.: Selective inhibition of enzymes utilizing alanine in the biosynthesis of peptidpglycan. Antimicrob. Agents Chemother., 304 - 313 (1967)

OKAMOTO, S. & Y. SUZUKI: Chloramphenicol-,Dihydrostreptomycin- and Kanamycin-inactivating enzymes from multiple drug resistant Escherichia coli carrying episome 'R'. Nature 208, 1301 - 1303 (1965)

OMURA, S., H. TANAKA, M. SHINOHARA, R. OIWA & T. HATA: Inhibition of bacterial cell wall synthesis by Amphomycin. Chemotherapy 5, 365 - 369 (1976)

OSBORN, M.J., P.D. RICK, V. LEHMANN, E. RUPPRECHT & M. SINGH: Structure and biogenesis of the cell envelope of Gram-negative bacteria. Ann.N.Y. Acad. Sci. 235, 52 - 65 (1974)

OVCHINNIKOV, Y.A., V.T. IVANOV, P.V. KOSTETSKY & M.M. SHEMYAKIN: The structur of Esperin. 1. Esperinic acid. Tetr. Lett. 43, 5285 - 5290 (1966)

PARKER, W.L. & M.L. RATHNUM: EM 49, a new peptide antibiotic. J. Antibiot. 26, 449 - 456 (1973)

PERKINS, H.R. & M. NIETO: The chemical basis for the action of the Vancomycin-group of antibiotics. Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 348 - 363 (1974)

PFROMMER, S.: Isolierung, Reinigung und Charakterisierung eines Antibiotikums aus Kulturen von Streptomyces exfoliatus. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1976)

PIRALI, S., S. SOMMA, G.C. LANCINI & F. SALA: Inhibition of peptide chain initiation in Escherichia coli by Thermorubin. Biochim. Biophys. Acta 366, 310 - 318 (1974)

PORALLA, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolidantibiotika. Dissertation, Universität Tübingen (1967)

RINGEL, S.M., R.C. GREENOUGH, S. ROEMER, D. DONNOR, A.L. GUTT, B. BLAIR, G. KANTNER & M. von STRANDTMANN: Ambruticin, a new antifungal antibiotic. J. Antibiot. 30, 371 - 375 (1977)

RUß, P.: Persönliche Mitteilung. Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen (1978)

SABATH, L.D., N. WHEELER, M. LAVERDIERE, D. BLAZEVIC & B.J. WILKINSON: A new type of Penicillin resistance of Staphylococcus aureus. Lancet 8009, 443 - 447 (1977)

SHAW, W.V.: The enzymatic acetylation of Chloramphenicol by extracts of R-factor resistant Escherichia coli. J. Biol. Chem. 242, 687 - 693 (1967)

SCHLEIFER, K.H., W.P. HAMMES & O. KANDLER: Effect of endogenous and exogenous factors on the primary structures of bacterial peptidoglycan. Adv. Microb. Physiol. 13, 245 - 292 (1976)

SCHLEIFER, K.H. & O. KANDLER: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implication. Bacteriol. Rev. 36, 407 - 477 (1972)

SHOJI, J. & T. KATO: The structure of Brevestin. J. Antibiot. 24, 380 - 389 (1975)

SHOJI, J., T. KATO & R. SAKAZAKI: The total structure of Cerexin A. J. Antibiot. 29, 1268 - 1274 (1976)

SIEWERT, G. & J.L. STROMINGER: Bacitracin: an inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 767 - 773 (1967)

SIDDHIKOL, C., J.W. ERBSTOESZER & B. WEISBLUM: Mode of action of Streptolydigin. J. Bacteriol. 99, 151 - 155 (1969)

SMITH, J.T., J.M.T. HAMILTON-MILLER & R. KNOX: Bacterial resistance to Penicillin and Cephalosporin. J. Pharm. Pharmacol. 21, 337 - 341 (1969)

SOMMA, S., W. MERATI & F. PARENTI: Gardimycin, a new antibiotic inhibiting peptidoglycan synthesis. Antimicrob. Agent Chemother. 11, 396 - 401 (1977)

SUZUKI, Y. & S. OKAMOTO: The enzymatic acetylation of Chloramphenicol by the multiple drug resistant Escherichia coli carrying R-factor. J. Biol. Chem. 242, 4722 - 4730 (1967)

STOEKENIUS, W. & R. ROWEN: A morphological study of Halobacterium halobium and its lysis in media of low salt concentrations. J. Cell Biol 34, 365 - 393 (1967)

STONE, K.J. & J.L.STROMINGER: Mechanism of action of Bacitracin: Complexation with metal ions and C_{55}-Isoprenyl Pyrophosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 3223 - 3226 (1971)

STORM, D.R.: Mechanism of Bacitracin action: A specific lipid -peptide interaction. Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 387 - 398 (1974)

TAMURA, G., F. SASAKI, M. MATSUHASHI, A. TAKATSUKI & M. YAMASAKI: Tunicamycin inhibits the formation of lipid intermediate in cell free peptidoglycan synthesis of bacteria. Agr. Biol. Chem. 40, 447 - 449 (1976)

TANAKA, H., Y. IWAI, R. OIWA, S. SHINOHARA, S. SHIMIZU, T. OKA & S. OMURA: Sudies on bacterial cell wall inhibitors. II. Inhibition of peptidoglycan synthesis in vivo and in vitro ba Amphomycin. Biochem. Biophys. Acta 497, 633 - 640 (1977)

THEIN, I.: Antibiotika aus Streptomyces cinnamomeus. Kirrothricin, ein weiterer Vertreter der Kirromycin-Gruppe. Dissertation Universität Tübingen (1977)

TOMASZ, A.: The role of autolysins in cell death. Ann. N.Y, Acad. Sci. 235, 439 - 447 (1974)

TOMASZ, A., A. ALBINO & E. ZANATI: Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. Nature (London) 227, 138-142 (1970)

TSUCHIYA, K. & Y. TAKEUCHI: Enduracidin, an inhibitor of cell wall synthesis. J. Antibiot. 21, 426 - 428 (1968)

TYNECKA, Z. & J.B. WARD: Peptidoglycan-synthesis in Bacillus licheniformis. Biochem. J. 146, 253 - 256 (1975)

UCHIDA, K. & K. AIDA: Acyl type of bacterial cell wall: Its simple identification by colorimetric methods. J.Gen. Appl. Microbiol. 23, 249 - 260 (1977)

WARD, J.B. & H.R. PERKINS: The direction of glycan synthesis in a bacterial peptidoglycan. Biochem. J. 135, 721 - 728 (1973)

WIRTZ, H.P.: Epidemiologie einer Parasitose; Simuliiden und Onchozerkose. Biologie in unserer Zeit 8, 1 - 7 (1978)

WOLF, H.: Kirromycin, ein Hemmstoff der Funktion der ribosomalen 30S-Untereinheit. Dissertation Universität Tübingen (1971)

WOLF, H., H. ZÄHNER & K. NIERHAUS: Kirromycin, an inhibitor of the 30S ribosomal aubunits function. FEBS Lett. 21, 347 - 350 (1972)

ZÄHNER, H.: Einige Aspekte der Antibiotica-Forschung. Angew. Chem. 89, 696 - 703 (1977)

ZÄHNER, H. & W.K. MAAS: Biologie of antibiotics. Springer-Verlag New York-Heidelberg-Berlin, 1972

ZEILER, H.J.: Stenothricin, ein neuer Hemmstoff der Mureinsynthese. Dissertation Universität Tübingen (1974)

LEBENSLAUF

1. 8. 1951	geboren in Bad Rothenfelde
1958 - 1962	Volksschule in Süchteln/Rhld.
1962 - 1970	Gymnasium in Viersen/Rhld.
15. 6. 1970	Abitur am Gymnasium Viersen
ab WS 1970/71	Studium der Biologie an der Universität Tübingen
27. 7. 1972	Diplomvorprüfung in Biologie
17. 12. 1975	Diplomprüfung in Biologie

Anschließend Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Zähner.

Meine akademischen Lehrer waren:

T.Babel, R.E. Bader, E. Bayer, F.W. Bentrup, V. Braun, D. Bunke, G. Dähn, H. Diekmann, R. Engelhorn, U. Feine, L. Flohe, W. Frank, G. Frösner, K.G. Grell, J. Guglielmi, F. Hartmann, K. Hoerner, U. Jockusch, E. Kalle, W. Kretschmar, H. Krüger, E. Kulzer, H. Lang, H. Lodemann, W. Löffler, J. Loeschke, K. Mägdefrau, G. Mickoleit, F.P. Möhres, M. Mörike, E. Müller, H. Ochsenfahrt, H. Pape, K. Poralla, W. Pracht, H. Probst, H. Remmer, A. Rieker, E. Sander, W. Schäfer, D.H. Schoop, B. Schwemmle, A. Seilacher, H. Seiler, K.F. Sewing, M. Siess, G. Uehlecke, U. Ullmann, U. Weser, G. Weitzel, G. Winkelmann, H. Winkler, D. Winne, H. Zähner